

Université de Montréal

Localisation régionale et subcellulaire du récepteur EphA7 dans l'hippocampe et le cervelet du rat adulte

Par

Clara A. Amegandjin

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de maîtrise

en pathologie et biologie cellulaires

Option système nerveux

Janvier 2015

© Clara A. Amegandjin, 2015

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Localisation régionale et subcellulaire du récepteur EphA7 dans l'hippocampe et le
cervelet du rat adulte

Présenté par :

Clara A. Amegandjin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pr Roger Lippé, président-rapporteur

Pr Guy Doucet, directeur de recherche

Pr Louis-Eric Trudeau, membre du jury

Résumé

EphA7 est un membre de la famille des récepteurs à tyrosine kinase, Eph, qui assume plusieurs rôles durant le développement du système nerveux central. Par ailleurs, il continue d'être fortement exprimé dans le cerveau adulte, notamment dans les régions reconnues pour leur grande plasticité synaptique, telles que l'hippocampe et le cervelet. Par hybridation *in situ*, nous avons cartographié la distribution de l'ARNm d'EphA7 dans le cerveau de rats et souris adultes. Les couches pyramidales du CA1 et CA3 et granulaire du gyrus dentelé de la formation de l'hippocampe ont montré le plus fort marquage. Un niveau d'ARNm d'EphA7 plus modéré a été observé dans l'habenula, le striatum, l'amygdale, le cervelet et le cortex cingulaire, piriforme et entorhinal. Quant à la protéine détectée par immunohistochimie, elle était fortement exprimée dans le neuropile de l'hippocampe et la couche des cellules de Purkinje du cervelet. En microscopie électronique, dans toutes les couches de l'hippocampe et du cervelet examinées, des épines dendritiques, des dendrites, des axones non-myélinisés, des terminaisons axonales et quelquefois des prolongements astrocytaires constituaient les éléments immunopositifs. Comme on pouvait déjà le voir en microscopie photonique, les corps cellulaires des cellules pyramidales et granulaires de l'hippocampe ainsi que des cellules de Purkinje du cervelet montraient aussi du marquage, surtout intracellulaire. L'analyse quantitative a révélé la localisation préférentielle d'EphA7 dans des dendrites et épines dendritiques. La majorité des épines marquées formaient des synapses asymétriques (excitatrices) avec des terminaisons axonales non marquées. La double localisation préférentielle d'EphA7

dans les dendrites ainsi que les densités post-synaptiques des épines dendritiques est compatible avec l'hypothèse d'un rôle d'EphA7 dans le maintien ou la fonction de certaines synapses du SNC adulte.

Mots-clés: Récepteur Eph, synaptogenèse, hippocampe, cervelet, synapse excitatrice, hybridation *in situ*, immunohistochimie, microscopie électronique

Abstract

EphA7 is a member of the Eph receptor tyrosine kinase family. It plays multiple roles during central nervous system development. In adult brain, EphA7 is still strongly expressed in certain regions, notably regions known to undergo active synaptic plasticity, such as the hippocampus and cerebellum. To examine the regional and cellular localization of EphA7 in adult brain, we used *in situ* hybridization as well as immunohistochemistry for light and electron microscopy. By *in situ* hybridization, the strongest signal was in hippocampus, notably the main cell layers of CA1, CA3 and dentate gyrus, and in cerebellar cortical Purkinje cells. However, moderate mRNA levels were found in habenula, striatum, amygdala, cingulate, piriform and entorhinal cortex and in the cerebellar cortex. After immunoperoxidase labeling, EphA7 appeared enriched in the neuropil layers of CA1, CA3 and DG as well as in Purkinje cell somata of the cerebellar cortex. In all examined layers of hippocampus and cerebellum, dendritic spines, dendrites, unmyelinated axons, axon terminals and some astrocytic leaflets were immunopositive for EphA7. Neuronal cell bodies of pyramidal, granular and Purkinje cells also showed some immunoreactivity, which was mainly intracellular. EphA7-labeled dendritic spines and dendrites represented the most frequently labeled components. The vast majority of labeled dendritic spines established asymmetric synapses with unlabeled axon terminals and thus displayed features of excitatory synapses. The dual preferential localization of EphA7 in dendrites and in the post-synaptic densities of dendritic spines provides morphologic

evidence in support of the hypothesis that EphA7 plays a key role in adult CNS synaptic maintenance or function.

Indexing terms: Eph, synaptogenesis, hippocampus, cerebellum, excitatory synapse, *in situ* hybridization, immunohistochemistry, electron microscopy

Table des matières

Localisation régionale et subcellulaire du récepteur EphA7 dans l'hippocampe et le cervelet du rat adulte	i
Résumé	ii
Abstract	iv
Table des matières	vi
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xi
Dédicace	xiii
Remerciements	xiv
Chapitre 1. Introduction	1
1. Mise en contexte	1
2. Récepteurs Eph et éphrines	3
2.1. Nomenclature et sélectivité de liaison	3
2.2. Structure moléculaire des Eph et des éphrines	5
2.3. Signalisation des Eph et des éphrines	6
2.3.1. Signalisation antérograde	6
2.3.2. Signalisation inverse	8
2.4. Récepteurs Eph, éphrines dans le système nerveux central	10

2.4.1. Récepteurs Eph et des éphrines dans l'hippocampe	12
2.4.2. Récepteurs Eph et éphrines dans le cervelet	17
2.5. EphA7 et le SNC	21
2.5.1 Généralités	21
2.5.2. Distribution d'EphA7 dans le SNC	22
2.5.3. Rôles d'EphA7 dans le développement du SNC	25
2.5.3.1. Détermination de la taille du cerveau	25
2.5.3.2. Fermeture du tube neural	28
2.5.3.3. Guidage axonal	30
2.5.4. Rôles d'EphA7 dans le SNC adulte	35
3. Hypothèses et objectifs	38
Chapitre 2	40
Regional Expression of EphA7 in Rodent Brain and Ultrastructural Localization in Hippocampus and Cerebellum of Adult Rat	40
Chapitre 3	79
1. Discussion	79
1.1. Localisation régionale d'EphA7	79
1.1.1. Hybridation in situ	79
1.1.2. Immunocytochimie	80
1.2. Localisation subcellulaire	82

1.2.1. EphA7 et la synapse	84
1.2.2. Données quantitatives	86
2. Conclusions et directions futures.....	88
3. Références	89
ANNEXE 1	100

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

Figure 1. Classification et sélectivité de liaisons des récepteurs Eph et éphrines	
.....	5
Figure 2. Structure protéique et voies de signalisation des Eph et des éphrines	
.....	11
Figure 3. Schéma descriptif de l'organisation de l'hippocampe	14
Figure 4. Localisation et direction de signalisation des Eph et des éphrines dans différentes régions de l'hippocampe des mammifères	
.....	19
Figure 5. Coupe transversale d'un folium de cervelet montrant l'organisation laminaire du cortex cérébelleux	
.....	21
Figure 6. Implication d'EphA7 dans la détermination de la taille du cerveau	
.....	30
Figure 7. Modèle descriptif du contrôle de l'organisation réciproque des projections cortico-thalamiques et thalamo-corticales par le récepteur EphA7 et les éphrines-A (notamment l'éphrine-A5)	
.....	34
Figure 8. Défauts de ciblage topographique des axones de la rétine nasale chez les animaux EphA7^{-/-}	
.....	36

Chapitre 2.

Regional Expression of EphA7 in Rodent Brain and Ultrasturcutral Localization in Hippocampus and Cerebellum of Adult Rat

Figure 1. Schematic representation of EphA7 and its variants.....69

Figure 2. Autoradiographs of EphA7 mRNA by in situ hybridization.....70

Figure 3. EphA7-immunolabeled sections from adult rat and wild-type mouse showing the same regional distribution pattern of EphA7 as seen by ISH.....71

Figure 4. EphA7-immunoreactive dendritic spines and dendritic branches.....72

Figure 5. EphA7-immunolabeled astrocytes, axons, and axons terminals.....73

Figure 6. Electron micrographs showing EphA7 immunolabeling in neuronal cell bodies from the granule cell layer and CA3 pyramidal cells.....74

Figure 7. EphA7-immunolabeled dendritic spines, axons terminals, astrocytic processes, and Purkinje cell somata in rat cerebellar cortex.....75

Figure 8. Number of labeled axons, dendrites, dendritic spines, and axon terminals.....76

Annexe 1.

Figure 1. Spécificité de la sonde anti-sens.....100

Liste des abréviations

AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

CA (CA1, CA2, CA3): cornu ammonis

DAB: 3,3'-tétrahydrochlorure de diaminobenzidine

E: jour embryonnaire

Eph: dérivé de cellules de carcinome hépatocellulaire productrices d'érythropoïétine (*Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma cell-derived*)

GD: gyrus dentelé

GPI: glycosylphosphatidylinositol

HEK: rein embryonnaire humain (*Human embryonic kidney*)

LTD: dépression à long terme (*Long-term depression*)

LTP: potentialisation à long terme (*Long-term potentiation*)

NMDA: N-méthyl-D-aspartate

P: jour postnatal

PDZ: postsynaptic density, disk large, zonula occludens

PSD: densité postsynaptique (*Postsynaptic density*)

PSD-95: protéine 95 de la PSD (*Postsynaptic density-95*)

RTK: récepteurs à tyrosine kinase

SAM: motif α -stérile (*Sterile alpha motif*)

SKF: famille des kinases de type Src (*Src family kinases*)

SNC: système nerveux central

TNFR : récepteur du facteur de nécrose tumorale (*Tumor necrosis factor receptor*)

ZSG : zone sous-granulaire

ZSV : zone sous-ventriculaire

Dédicace

À mon ami et frère Claver

À mon père Prosper

À ma mère Florence

Remerciements

Au cours de ce merveilleux voyage qu'a été ma formation, je n'ai eu de cesse que d'avoir tout le temps été épaulée, soutenue, comprise, enseignée, voilà pourquoi il m'est impératif d'écrire ces quelques lignes afin d'exprimer ma très grande et profonde gratitude envers tous ceux qui de près ou de loin ont contribué au bon déroulement de cette étape de ma vie.

À cet effet je tiens à exprimer ma reconnaissance envers mon directeur de recherche en la personne du Pr Guy Doucet pour m'avoir non seulement permis d'intégrer son laboratoire de recherche mais aussi d'avoir été présent pour moi tout au long de mon parcours. Je loue vivement sa compréhension, sa disponibilité, sa gentillesse, ses précieux conseils et sa patience.

Grande également est ma gratitude envers Ginette Guay, Michel Lauzon et Diane Gingras qui m'ont appris la technique de la microscopie électronique et qui ont toujours été présents pour répondre à chacune de mes questions- qui par ailleurs étaient nombreuses- avec patience et sourire.

Je remercie aussi très chaleureusement Dr Roger Lippé qui a accepté présider le jury d'évaluation de mon mémoire et aussi Dr Louis-Éric Trudeau d'avoir accepté non seulement de faire partie de mon comité de parrainage mais aussi de lire et critiquer mon mémoire en tant que membre de jury.

Mes remerciements s'expriment également à l'endroit de Dre Valérie Mongrain, de Mustapha Riad et de tous les membres du Département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal.

Enfin, qu'il me soit permis d'exprimer ma reconnaissance envers mon ami Marius Chiasseu pour sa disponibilité, lui qui n'a jamais hésité à me venir en aide lorsque le besoin se faisait ressentir.

Chapitre 1. Introduction

1. Mise en contexte

Le développement et la morphogenèse constituent deux processus qui dépendent de la communication entre les cellules. Cette communication est cruciale pour la détermination du devenir de la cellule. Dans la plupart des cas, les cellules sont multipotentes et doivent sonder leur environnement afin de recevoir les directives leur permettant de prendre les décisions développementales adéquates. Dans ce contexte, les récepteurs localisés à la surface de la cellule, notamment les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) représentent des molécules essentielles contrôlant ces processus (Shilo, 1992). Avec leurs ligands, ils représentent des facteurs « de croissance » et « de guidage » nécessaires pour l'établissement des connexions neuronales lors de l'embryogenèse ainsi que pour le maintien du système nerveux mature. La réponse des neurones à la signalisation de ces récepteurs est très variable, mais inclut la prolifération et la migration, l'établissement et la maintenance des synapses aussi bien que la survie des neurones (Hilborn et al., 1998). D'un point de vue morphologique, la principale caractéristique de cette famille de récepteurs est la présence d'un domaine cytoplasmique à activité kinase responsable de l'activité enzymatique, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine extracellulaire, ce dernier est très divergent et représente le domaine de liaison des ligands.

Les récepteurs Eph constituent la plus grande sous-famille de récepteurs à tyrosine kinase (Himanen and Nikolov, 2003; Murai and Pasquale, 2004). Avec leurs ligands que sont les éphrines, ils sont des médiateurs importants de la communication entre les cellules. Ayant la structure moléculaire classique des autres membres des récepteurs à tyrosine kinase, leur principal rôle est la transduction du signal de l'extérieur de la cellule vers son intérieur par l'intermédiaire de leur domaine kinase. Cependant, les récepteurs Eph constituent un groupe unique de RTK, puisqu'ils sont capables d'établir une signalisation bidirectionnelle avec les éphrines, auquel cas le récepteur peut se comporter comme un ligand et vice-versa (Pasquale, 2005; Lisabeth et al., 2013). Durant le développement du système nerveux central (SNC) en particulier, mais aussi de plusieurs autres systèmes périphériques (formation de vaisseaux sanguins, formation de l'oreille interne...), la communication intercellulaire Eph/éphrine joue un rôle déterminant dans le comportement des cellules, y compris l'attraction ou la répulsion, l'adhésion ou la dés-adhésion, influençant ainsi la migration, entre autres. Ainsi, le système Eph/éphrine influence le destin cellulaire et, ce faisant, la morphogenèse et l'organogenèse (Klein, 2004).

2. Récepteurs Eph et éphrines

2.1. Nomenclature et sélectivité de liaison

À mesure de leurs découvertes, les récepteurs Eph aussi bien que les éphrines ont reçu une grande diversité de noms. Ainsi, un même récepteur ou ligand était désigné par une multitude d'acronymes selon l'espèce chez laquelle ils avaient été isolés. Il a fallu les travaux d'un comité qui a organisé une nomenclature cohérente où les récepteurs sont désormais désignés « **Eph** », à partir du premier membre découvert, ainsi désigné parce qu'il était exprimé dans une lignée de cellules cancéreuses hépatiques produisant de l'érythropoïétine (« *Erithropoietin-Producing human Hepatocellular carcinoma cell line* ») et numérotés selon l'ordre de leur découverte. Les ligands, quant à eux, ont été regroupés sous le nom d'« **éphrines** » (« *Eph family receptor interacting proteins* ») (Eph Nomenclature Committee, 1997). Chez les mammifères, on dénombre 14 récepteurs Eph contre 8 éphrines. En se basant sur la conservation de la séquence du domaine extracellulaire et la réciprocité des affinités de liaisons avec les éphrines, les récepteurs Eph ont été subdivisés en deux classes à savoir EphA et EphB. Il en fut de même pour les éphrines qui ont été subdivisées en éphrines-A et éphrines-B (Gale et al., 1996; Pasquale, 2005). L'existence d'une promiscuité de reconnaissance entre les éphrines et les Eph explique le fait que les EphA (EphA1-8, et 10) se lient aux éphrines-A, qui sont ancrées à la membrane plasmique par un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI) (éphrine-A1-5), de même les EphB (EphB1-4, et 6) se lient aux éphrines-B qui sont transmembranaires (éphrine-B1-3). Deux exceptions

notables : EphA4 et EphB2 qui, en plus de leurs liaisons normales, peuvent se lier respectivement aux éphrines-B ou -A (Gale et al., 1996; Himanen et al., 2004; Pasquale, 2004) (Fig. 1).

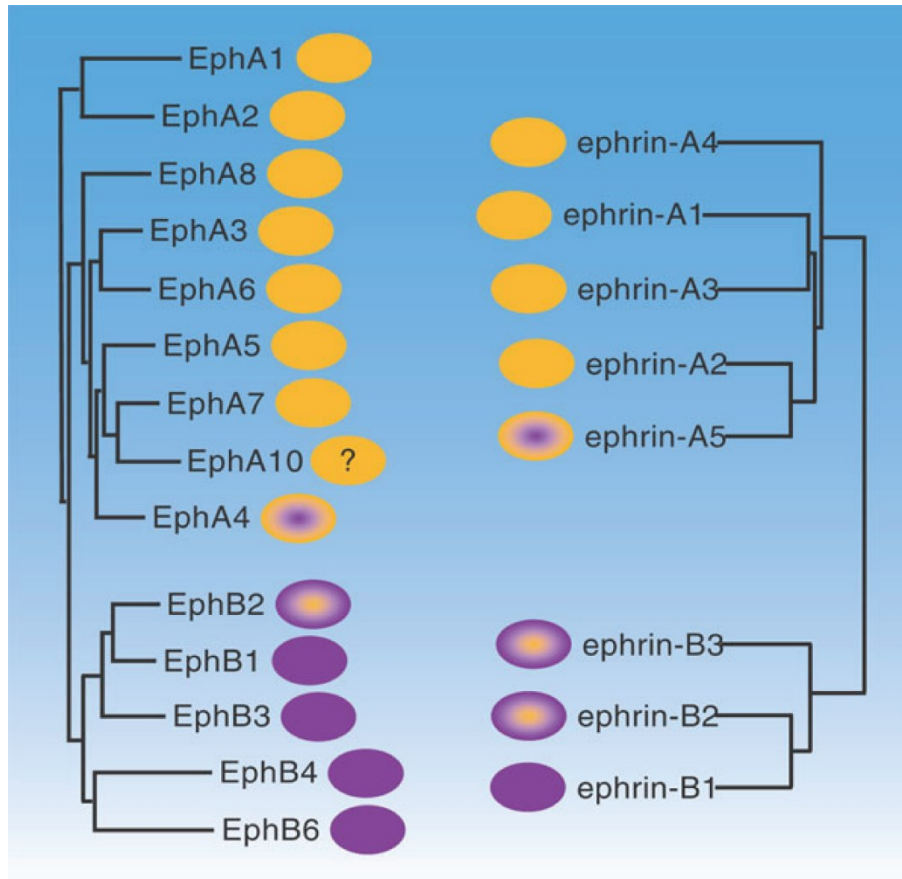


Figure 1 : Classification et sélectivité de liaisons des récepteurs Eph et des éphrines.

Les récepteurs EphA et EphB ont une très forte affinité de liaison aux éphrines-A ou-B, respectivement. Les exceptions à cette classification sont EphA4 et EphB2 qui peuvent

se lier, quoique avec des affinités plus faibles aux éphrines-B ou -A respectivement. (Reproduite avec permission, de Pasquale, 2004).

2.2. Structure moléculaire des Eph et des éphrines

Comme mentionné précédemment, les récepteurs Eph ont la structure moléculaire typique des RTK à savoir un domaine extracellulaire de liaison aux ligands, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique responsable de l'activité kinase. Le domaine extracellulaire est composé d'une portion globulaire, représentant le domaine de liaison aux éphrines, suivie d'une région riche en résidus cystéine et de deux domaines à séquences répétées de fibronectine III (impliqués dans les interactions de dimérisation récepteur- récepteur) (Goldshmit et al., 2006).

Concernant la partie cytoplasmique des récepteurs Eph, elle peut être divisée en quatre (4) unités fonctionnelles à savoir un domaine juxta-membranaire contenant deux (2) résidus tyrosine et représentant un site d'autophosphorylation du récepteur, un domaine tyrosine kinase classique, un domaine à motif α -stérile (SAM « *Sterile Alpha Motif* ») et, finalement, un domaine de liaison aux protéines PDZ (« *Postsynaptic density, Disk large, Zonula occludens* »). Le domaine SAM est constitué d'environ 70 acides aminés et représente un indicatif de la capacité des Eph à former des dimères ou des oligomères (Kullander and Klein, 2002).

Les éphrines ont une structure moléculaire beaucoup plus simple que les récepteurs Eph. Les éphrines-A sont constituées d'un domaine extracellulaire, représentant le domaine de liaison aux récepteurs, et sont rattachées à la membrane par

une ancre GPI. Les éphrines-B, par contre, sont plus sophistiquées que leurs homologues de classe A et, outre la portion extracellulaire de liaison aux Eph, elles possèdent une portion transmembranaire à laquelle est rattachée une queue cytoplasmique se terminant par un domaine de liaison à motif PDZ (Goldshmit et al., 2006) (Fig. 2).

2.3. Signalisation des Eph et des éphrines

Les interactions Eph-éphrines sont qualifiées *d'unique*s car, bien qu'ayant une forte homologie moléculaire avec les autres RTK, les Eph sont les seuls capables d'établir une signalisation très atypique avec leurs ligands qui est qualifiée de *bidirectionnelle*, c'est-à-dire *antérograde* (induite par l'Eph) et *inverse* (induite par l'éphrine). Dans cette optique, le récepteur peut devenir le ligand et inversement (Fig. 2).

2.3.1. Signalisation antérograde

Une agglomération des éphrines est nécessaire pour initier l'activation des Eph. En effet, ces éphrines agglomérées, en se liant aux Eph, vont faire s'agglomérer ces derniers et ainsi induire l'autophosphorylation de plusieurs résidus tyrosine de la portion intracellulaire du récepteur. Notons que l'autophosphorylation des 2 résidus tyrosines du domaine juxta-membranaire est nécessaire pour l'activation totale du domaine tyrosine kinase du récepteur. Une fois la phosphorylation des résidus tyrosine du domaine juxta-membranaire complétée, ce dernier se détachera, aboutissant à la

conversion du domaine kinase en son état actif. À partir de ce moment, on peut parler de l'activation effective du récepteur. Il se produit alors un recrutement de molécules adaptatrices telles que les protéines Grb4 ou Nck qui sont porteuses de domaines fonctionnels SH2 (Src-Homology-2) et SH3. Ces molécules d'adaptation sont dépourvues d'activité enzymatique intrinsèque et ont pour fonction la formation de connexions entre molécules de signalisation, en amont et en aval, dans la voie de signalisation (Kullander and Klein, 2002; Pasquale, 2005). Parmi les voies de signalisation activées par les Eph, on compte celles des petites GTPases de la famille Rho (RhoA, Rac1, Cdc42). L'activation de ces voies par les Eph serait responsable de la régulation des mouvements de l'actine du cytosquelette. Par ailleurs, la signalisation par d'autres voies comme celle de la famille de GTPases Ras peut aussi être induite par l'activation de récepteurs Eph. En effet, il a été démontré dans des neurones en culture que l'activation des EphA inhibe Erk, résultant en la suppression des effets du récepteur TrkB des neurotrophines sur la motilité et l'expression de gènes dans les cônes de croissance (Meier et al., 2011). Ce phénomène promouvrait alors un affaissement de ces cônes (Nie et al., 2010).

La signalisation antérograde Eph/éphrine active également la voie de signalisation des Akt. Les Akt sont des molécules dont l'activité régule la taille de la cellule ainsi que sa prolifération et sa survie, via des effecteurs tels que le complexe mTOR1 (mTORC1 pour «*mTOR complexe 1*»). Contrairement aux autres RTK activant cette voie, la signalisation antérograde des Eph peut la réprimer. Cela se produit notamment dans certains types de cancers (Lisabeth et al., 2013).

2.3.2. Signalisation inverse

La signalisation inverse est celle qui se déroule dans les cellules exprimant les éphrines. Rappelons que les éphrines sont dépourvues de domaine enzymatique, ce qui rend encore plus intéressant ce concept de *signalisation inverse*, surtout en ce qui concerne les éphrines-A qui n'ont pas de domaine intracellulaire.

Les études portant sur les éphrines-B ont démontré que la signalisation inverse par ces molécules était fonction de l'activation des kinases de la famille Src (« *Src Family Kinases* », ou SKF). La liaison des récepteurs EphB aux éphrines-B causerait ainsi la phosphorylation de ces dernières par des kinases Src, résultant en la création de sites de liaison au niveau des domaines SH2 de protéines adaptatrices telles que Grb4. La signalisation par le biais des Grb4 contrôlerait l'élagage des axones ainsi que l'établissement de synapses et la formation d'épines dendritiques lors du développement de l'hippocampe chez la souris. Un autre processus de signalisation possible est la phosphorylation de résidus sérines localisés au bout c-terminal de l'éphrine. Ce type de signalisation est nécessaire pour la stabilisation des récepteurs AMPA au niveau des synapses. Par ailleurs, on peut aussi assister au recrutement de protéines à domaine PDZ au bout c-terminal des éphrines-B. C'est le cas de RGS3 qui a pour rôle de relier une éphrine-B à des récepteurs couplés à des protéines G contrôlant la migration cellulaire ou l'auto-renouvellement de progéniteurs neuraux (Kullander and Klein, 2002; Lisabeth et al., 2013).

Les éphrines-A, bien que dépourvues de domaine intracellulaire, sont aussi capables d'induire une signalisation *inverse*. Il a été démontré que cette activité signalétique des éphrines-A dépendait de corécepteurs transmembranaires tels que le

récepteur à basse affinité des neurotrophines, p75, ou d'autres RTK comme TrKB et Ret (Lim et al., 2008; Marler et al., 2008; Marler et al., 2010). Cette signalisation inverse des éphrines-A agit notamment sur le guidage axonal. D'autres partenaires tels que les kinases Src, Fyn, Akt, Rac1 et certaines intégrines sont impliqués dans ce type de signalisation (Lisabeth et al., 2013).

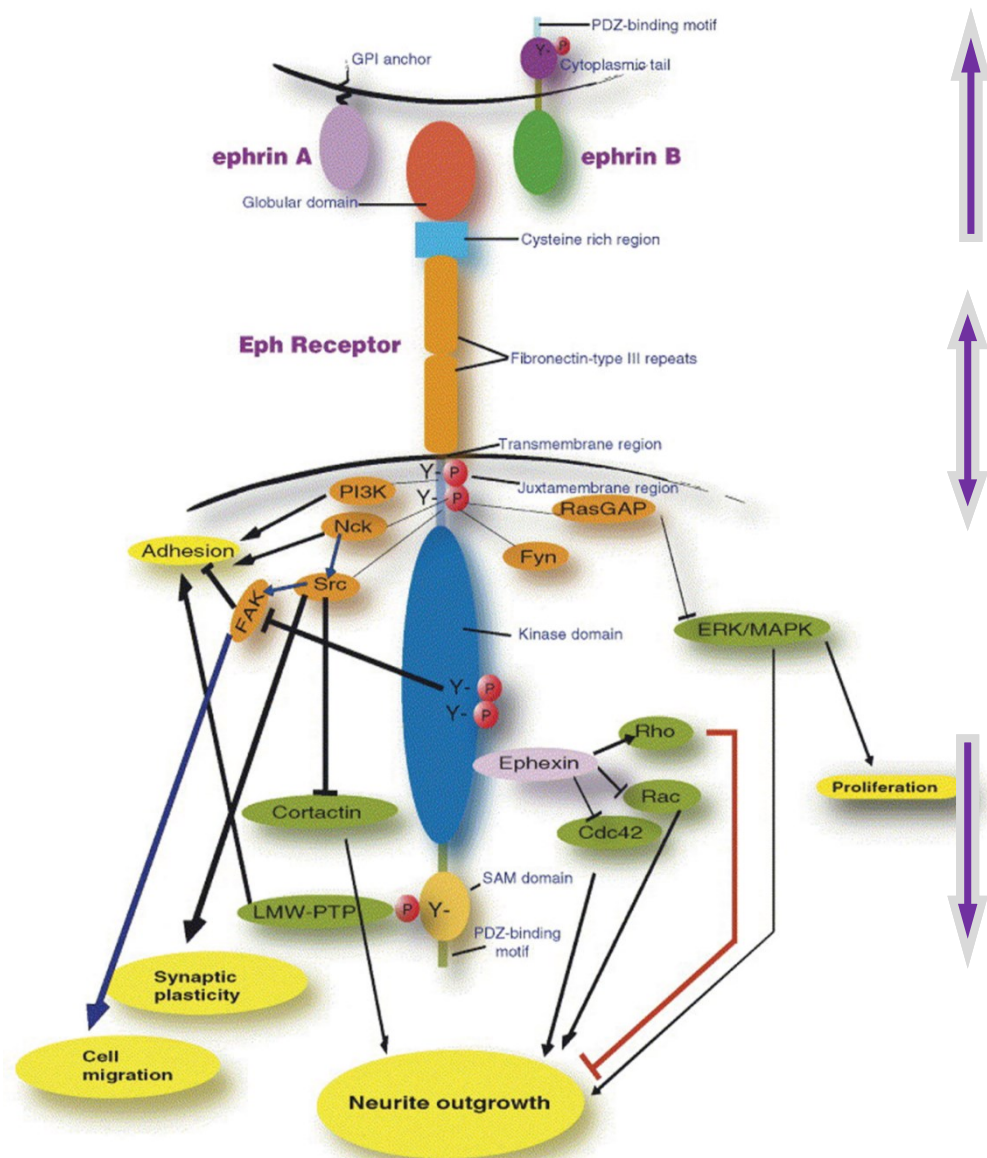


Figure 2: Structure protéique et voies de signalisation des Eph et des éphrines.

L'activation des récepteurs Eph peut induire plusieurs voies de signalisation conduisant au remodelage du cytosquelette, ce qui résulte en la promotion ou l'inhibition de la migration cellulaire, de la prolifération, de l'extension de neurites, ou de l'adhésion et de la plasticité synaptique (Reproduite et adaptée, avec permission, de Goldshmit et al, 2006).

2.4. Récepteurs Eph, éphrines dans le système nerveux central

Les récepteurs Eph et les éphrines ont été impliqués dans un grand nombre de processus développementaux du SNC, tels que la migration cellulaire, la croissance et le guidage axonal, notamment l'organisation topographique, la fasciculation axonale et la formation de vaisseaux sanguins (Goldshmit et al., 2006). Au cours du développement du SNC, on assiste à une expression en gradients complémentaires de la plupart de ces molécules contribuant à la compartimentation de plusieurs structures anatomiques, tels le striatum (Janis et al., 1999; Tai et al., 2013), le néocortex (Yun et al., 2003; Torii et al., 2013), l'hippocampe (Martinez et al., 2005), et le cervelet (Karam et al., 2000; Karam et al., 2001). Il en est de même pour l'établissement des projections rétinotopiques dans le tectum et le colliculus, ce dernier représentant le modèle le plus étudié de guidage axonal et de cartographie topographique basé sur des gradients d'expression complémentaires des Eph/éphrines (Scalia et al., 2009; Scicolone et al., 2009). Par ailleurs, des processus comme la fermeture du tube neural (Lee et al., 2013a) ou le contrôle de la taille du cerveau (Depaepe et al., 2005) sont sous l'égide des Eph/éphrines. De plus, il a été rapporté que la plupart de ces molécules

continuaient d'être fortement exprimées dans le cerveau adulte (Liebl et al., 2003; Yamaguchi and Pasquale, 2004) où elles ont été impliquées, entre autres, dans la neurogenèse (Ashton et al., 2012; Jing et al., 2012), le blocage de la neuro-régénération (Palmer and Klein, 2003) ou la régulation du développement des épines dendritiques (Yamaguchi and Pasquale, 2004). Des études récentes ont enfin associé les Eph/éphrines à la régulation de la gliotransmission (Zhuang et al., 2011).

2.4.1. Récepteurs Eph et des éphrines dans l'hippocampe

L'hippocampe représente la structure la plus utilisée comme modèle dans l'étude des mécanismes cellulaires de la mémoire et de l'apprentissage, plus particulièrement dans les mécanismes moléculaires des phénomènes de potentialisation à long terme (LTP) et de la dépression à long terme (LTD). De plus l'hippocampe possède une organisation laminaire des plus simples ainsi qu'une circuiterie neuronale bien caractérisée. Ainsi, l'information qui traverse cette région anatomique passe successivement par 3 régions distinctes à savoir le gyrus dentelé (GD) et les régions CA3 et CA1 (Fig. 3) (Paxinos and Watson, 1986). Cette circuiterie unidirectionnelle est connue sous le vocable de *circuit tri-synaptique de l'hippocampe*.

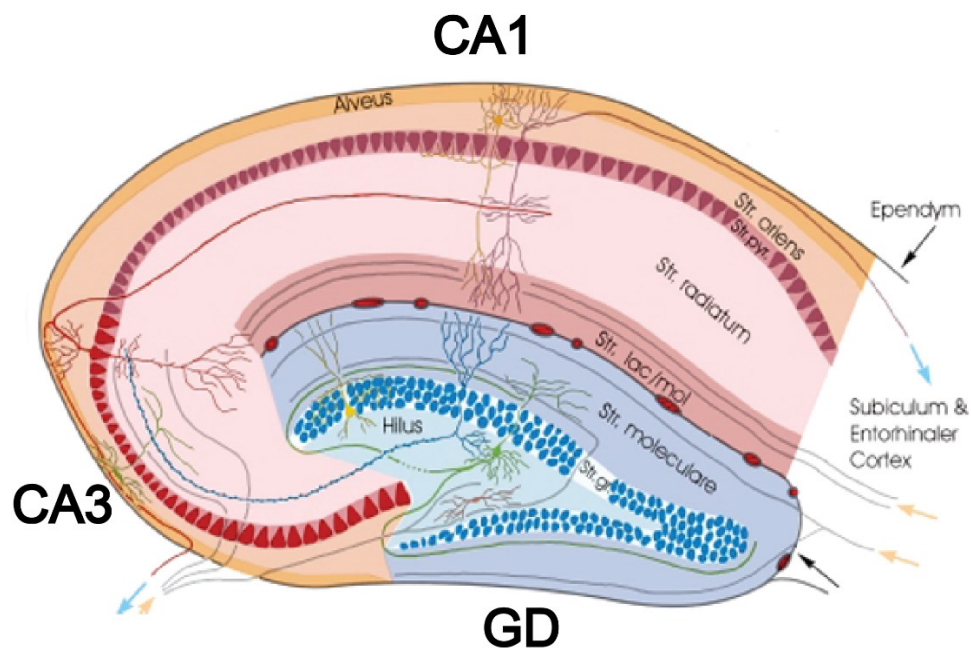


Figure 3 : schéma descriptif de l'organisation de l'hippocampe.

Chaque sous-région à savoir le CA1, le CA3 et le gyrus dentelé (GD) sont constituées d'une superposition de différentes sous-couches faisant d'elles des structures laminaires. Stratum oriens, stratum pyramidale, stratum radiatum et stratum lacunosum/moleculare de CA1. Stratum oriens, stratum pyramidale et stratum radiatum de CA3. Stratum moleculare, stratum granulosum et le hilus (ou couche polymorphe) du gyrus dentelé. (Tirée et modifiée de anatomie.vetmed.uni.leipzig.de).

Une multitude d'études ont révélé que plusieurs éphrines et Eph étaient exprimés dans les principaux neurones de l'hippocampe en développement (Fig. 4). Par exemple, les neurones pyramidaux du CA1 expriment l'éphrine-B2 et EphB3, tandis que ceux du CA3 et les cellules granulaires du gyrus dentelé contiennent l'éphrine-B3 et EphB1. EphB2 et EphA4, par contre, sont présents de façon ubiquitaire dans tous les neurones de l'hippocampe en constitution (Liebl et al., 2003). Des études *in vitro* ont par ailleurs révélé que les éphrines-A2, A3, A5 et le récepteur EphA5 sont impliqués dans l'organisation régionale laminaire des connexions hippocampiques (Martinez et al., 2005).

D'un point de vue fonctionnel, l'information destinée au circuit hippocampique est transmise par les axones du cortex entorhinal, puis relayée par les neurones du gyrus dentelé. Des cellules granulaires du gyrus dentelé, partent les fibres moussues qui établissent un second relais avec les dendrites des cellules pyramidales du CA3 dont les axones se ramifient ensuite en deux voies : l'une qui constitue les fibres commissurales et l'autre qui forme les collatérales de Schaffer. Il a été démontré que l'éphrine-A5 module le bon développement et l'établissement des connexions des axones

commissuraux. En effet chez les souris éphrine-A5^{-/-}, les projections commissurales sont altérées et les épines dendritiques, les synapses ainsi que les terminaisons axonales des fibres moussues sont moins abondantes que chez les animaux témoins. Cela révèle l'implication de la signalisation de l'éphrine-A5 dans la formation et la maturation de certaines synapses de l'hippocampe (Otal et al., 2006; Akaneya et al., 2010). Des observations *in vitro* de la croissance des axones de l'hippocampe ont aussi permis de comprendre qu'en présence des éphrines-A2, -A3 et -A5, il se produit une croissance axonale importante et, par la suite, un élagage des axones surnuméraires (Gao et al., 1999). Henderson et al. (2001) ont étudié le rôle du récepteur EphB2 dans la régulation de la fonction synaptique au cours du développement postnatal de l'hippocampe des mammifères. En effet, les auteurs ont remarqué que lorsqu'on empêche l'expression du récepteur EphB2 dans les cellules du CA1 et du GD, on assiste à une réduction de la LTP, se reflétant par une diminution du courant synaptique dépendant du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Inversement, une stimulation glutamatergique des neurones de l'hippocampe *in vivo* engendrait une augmentation de l'expression du récepteur EphB2.

Le système Eph/éphrine a aussi été très largement impliqué dans la formation des épines dendritiques au cours du développement de l'hippocampe. Par exemple il a été reporté que l'éphrine-A3 était localisée dans des prolongements astrocytaires se trouvant proches des terminaisons axonales et le récepteur EphA4 dans les épines dendritiques. L'investigation du rôle possible de l'éphrine-A3 et du récepteur EphA4 a permis de constater, sur tranches de cerveau, qu'à la suite de l'application de l'éphrine-A3-Fc il y avait une réduction de la taille et de la densité des épines dendritiques ainsi

qu'une diminution de la dimension de la tête de ces épines. Soit dit en passant, l'éphrine-A3-Fc représente l'éphrine-A3 fusionnée au fragment IgG de l'anticorps humain. Son rôle selon qu'elle soit agglomérée ou pas est de respectivement activer ou empêcher l'activation du récepteur. Par contre chez les animaux EphA4^{-/-}, l'absence du récepteur EphA4 aboutissait à la formation d'épines ayant une morphologie irrégulière et une longueur significativement supérieure à la normale (filopodes). Ces épines étaient aussi très nombreuses et certaines d'entre elles se chevauchaient (Murai et al., 2003). Il a aussi été noté que les épines des souris éphrine-A3^{-/-} montraient les mêmes anomalies que celles des EphA4^{-/-}, de plus chez ces animaux, on assistait à une augmentation du nombre de transporteurs de glutamate et à une diminution de la capacité d'apprentissage (Carmona et al., 2009). Plus tard, une autre étude a permis de réaliser que l'activation du récepteur EphA4 par l'éphrine-A3 inhibe la voie de signalisation des intégrines (Bourgin et al., 2007). Ainsi dans l'hippocampe, la signalisation EphA4/éphrine-A3 serait critique pour le maintien de l'organisation dynamique des épines dendritiques lors du remodelage synaptique. En d'autres termes, éphrine-A3 et EphA4 serviraient plus à la stabilisation de la morphologie des épines de l'hippocampe qu'à la promotion de leur croissance (Palmer and Klein, 2003).

Quant à Henkemeyer et al. (2003), ils ont étudié la formation et la morphologie des épines dendritiques dans l'hippocampe de souris EphB1, EphB2, EphB3 triples knockouts. Dans un premier temps ils ont examiné *in vitro* la morphogenèse des épines. Ils se sont rendu compte que chez ces animaux, les épines n'acquerraient pas leur forme normale, restant longues, fines et immatures. De plus l'examen des synapses a révélé que les molécules pré- et post-synaptique à l'instar de la synaptophysine et PSD-95

respectivement étaient délocalisées. Les mêmes analyses ont été reprises *in vivo* confirmant l'implication de ces 3 récepteurs dans la formation des épines dendritiques des neurones pyramidaux de l'hippocampe. Les auteurs ont aussi reporté que chez ces mutants EphB1^{-/-}/EphB2^{-/-}/EphB3^{-/-}, il y avait une réduction du nombre de synapses excitatrices glutamatergiques. Tout ceci a permis de conclure que la formation des épines dendritiques des neurones hippocampiques et leur maturation dépendait de la signalisation des récepteurs EphB.

En synergie avec leur implication dans la morphogenèse des épines dendritiques au cours du développement, les interactions Eph/éphrines ont été largement étudiées pour leur rôle dans la synaptogenèse, la plasticité synaptique, la mémoire et l'apprentissage chez l'adulte (Contractor et al., 2002; Murai and Pasquale, 2002; Martinez and Soriano, 2005; Hruska and Dalva, 2012).

Chez l'adulte, il a également été observé que les Eph/éphrines régulaient la neurogenèse dans le gyrus dentelé. Par exemple, une étude a révélé que par suite d'une lésion traumatique du cerveau, le récepteur EphB3 inhibait l'expansion de la population des cellules progénitrices neurales, en régulant l'expression de la protéine p53 (Theus et al., 2010). De plus, la signalisation induite par l'éphrine-B2, localisée sur les astrocytes et activée par EphA4 exprimé par les cellules souches neurales activerait la voie β -caténine aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, entraînant une augmentation de certains facteurs de transcription, et favorisant ainsi la différenciation neuronale de cellules souches. Inversement, chez les souris EphA4^{-/-}, on a plutôt observé une baisse de la prolifération des cellules progénitrices et une différenciation prématurée de celles-ci (Khodosevich et al., 2011; Ashton et al., 2012).

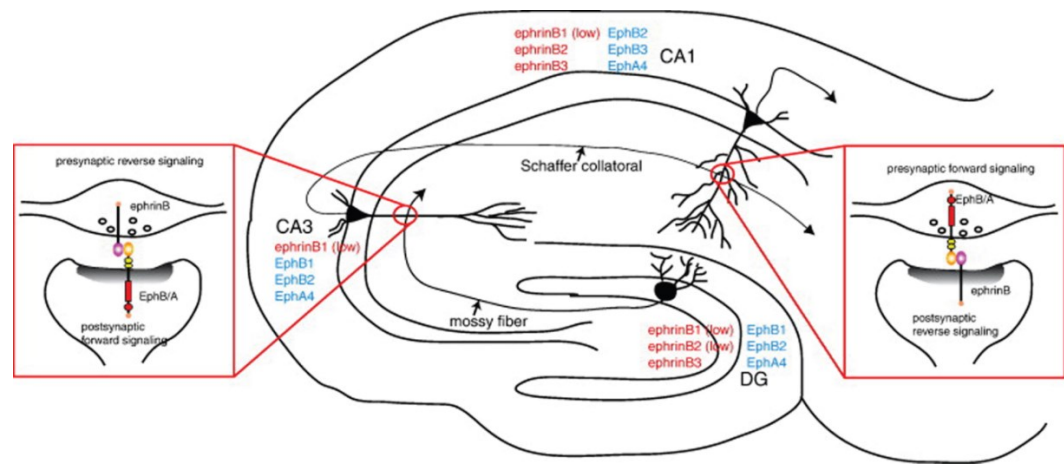


Figure 4 : Localisation et direction de signalisation des Eph et éphrines dans différentes régions de l'hippocampe des mammifères.

Ces molécules sont localisées au niveau des densités pré et postsynaptiques et grâce à leur signalisation bidirectionnelle elles permettent la circulation de l'information dans toute la circuiterie hippocampique. (Reproduite et adaptée, avec permission, d'Aoto and Chen, 2007).

2.4.2. Récepteurs Eph et éphrines dans le cervelet

Rares sont les études qui ont investigué l'expression des Eph/éphrines et leurs rôles dans le cervelet. Tout comme l'hippocampe, le cervelet est caractérisé par son grand potentiel de plasticité et représente une structure des plus organisées aussi bien au niveau architectural que moléculaire. Il a notamment comme rôle le contrôle moteur et la mémoire des apprentissages moteurs (Roostaei et al., 2014). Au-delà de son rôle moteur, il contribue également aux fonctions non-motrices telles que cognitive, affective et de changements d'humeur (Bellebaum and Daum, 2007; Timmann and Daum, 2007). Des expériences d'hybridation *in situ* ont révélé que les éphrines-B1 et -

B2, ainsi que les récepteurs Eph-B1, -B2, -B3 et -A4 étaient exprimés dans différentes régions du cervelet en développement (Liebl et al., 2003). D'un point de vue architectural, le cervelet est constitué de 10 lobules (I à X, selon Voogd). Il a été démontré que, lors de la formation de quelques-uns de ces lobules, les Eph/éphrines comptaient parmi les premières molécules à être exprimées (dès E17.5), bien avant que les lobules soient évidents, suggérant un rôle morphogénétique ou organisateur. Ils serviraient à définir les régions éventuellement occupées par chaque lobule. Ainsi les auteurs ont trouvé que les Eph-A7, -A3 et -A5 étaient localisés dans les lobules VI et VII, tandis que des éphrines-A étaient confinées au lobule VIII. De leur côté, des EphB étaient exprimés dans les lobules VII, VIII et IX (Rogers et al., 1999a).

Par ailleurs l'anatomie du cervelet montre une organisation laminaire, soit une couche moléculaire (la plus externe), suivie d'une couche des cellules de Purkinje et, enfin, une couche granulaire (Fig. 5).

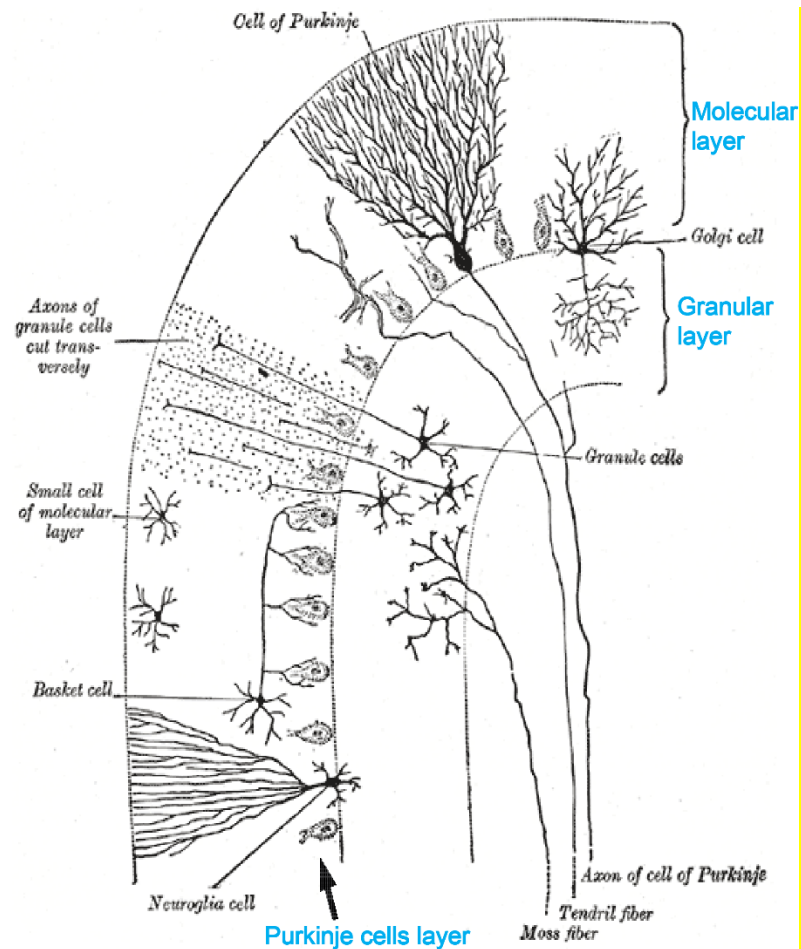


Figure 5 : Coupe transversale d'un folium de cervelet montrant l'organisation laminaire du cortex cérébelleux.

À la base se trouve la couche granulaire remplie de cellulaires granulaires et d'interneurones. Ensuite vient la couche de cellules de Purkinje qui est une couche étroite. Elle contient uniquement les corps cellulaires de cellules de Purkinje. La couche moléculaire est la couche la plus externe, on y trouve les dendrites des cellules de Purkinje, les axones des cellules granulaires ainsi que d'autres types de cellules inhibitrices (Tirée et modifiée de en.wikipedia.org).

L'expression spatiotemporelle des EphA4, -A3 et -B2, ainsi que des éphrines-B1, -A2 et -A5 serait responsable de cette compartimentation, de même que de la migration des cellules granulaires aux endroits appropriés. Les auteurs de cette étude ont à prime abord mis l'accent sur l'importance d'EphA4 dans la formation de la couche des cellules de Purkinje (Karam et al., 2000). Par la suite, ces mêmes auteurs ont démontré que, contrairement à ce qu'ils pensaient, l'absence d'EphA4 n'empêche pas la formation adéquate de la couche des cellules de Purkinje, expliquant cette situation par une compensation de sa fonction par les éphrines-A1, -B2 et le récepteur EphA2 (Karam et al., 2001). Toutes ces études se sont limitées à la description de l'expression des Eph/éphrines, ce qui fait qu'en fin de compte on ne comprend toujours pas jusqu'à quel degré la signalisation par ces molécules était indispensable au développement du cervelet.

Les cellules de Purkinje sont caractérisées par leur gigantesque arborisation dendritique. Ces dendrites sont contactées dans leur domaine proximal par les fibres grimpantes de l'olive inférieure et dans leur domaine distal par les fibres parallèles des cellules granulaires. Dans le domaine proximal, on trouve très peu d'épines et de synapses alors que c'est tout le contraire pour le domaine distal dans lequel on retrouve beaucoup d'épines dendritiques et de synapses (Cesa et al., 2011). Très récemment, Cesa et collaborateurs ont révélé que la signalisation induite par les récepteurs Eph serait impliquée dans la régulation de la prolifération des épines dendritiques des cellules de Purkinje, contribuant ainsi à la maintenance de l'architecture du cortex cérébelleux aussi bien chez les nouveau-nés que chez les adultes. En effet, lorsque les auteurs ont inhibé *in vitro* tous les récepteurs EphA et B, en utilisant la protéine de

fusion EphA4/Fc (EphA4 fusionné au fragment Fc de l'anticorps IgG humain), ils ont remarqué une très forte prolifération d'épines dendritiques dans le domaine proximal des dendrites des cellules de Purkinje, sans changement dans leur domaine distal. Ces observations ont été corroborées avec l'utilisation de souris triples knockouts EphB1^{-/-}/EphB2^{-/-}/EphB3^{-/-} qui montraient également une augmentation de la densité des épines dendritiques dans le domaine proximal des dendrites des cellules de Purkinje (Cesa et al., 2011).

2.5. EphA7 et le SNC

2.5.1 Généralités

Le récepteur EphA7 a été isolé de façon indépendante chez différentes espèces telles que l'humain (HeK11), le rat (Ehk) et la souris (Mdk1, Ebk) (Ciossek et al., 1995; Valenzuela et al., 1995; Zhou, 1998). Il existe cinq isoformes du récepteur EphA7 chez la souris, à savoir EphA7-FL (« *full-length* », ou MDK1 dans l'ancienne nomenclature) qui représente la version complète du récepteur, MDK1Δ1 et MDKΔ2 caractérisées par des délétions de 5 et 4 acides aminés au niveau de leur domaine extracellulaire ou juxta-membranaire, respectivement, et les isoformes tronquées MDK1-T1 (EphA7-T1) et MDK-T2 (EphA7-T2), privées du domaine kinase et ne possédant que ~20 acides aminés du domaine juxta-membranaire intracellulaire. Ces isoformes sont le produit d'une régulation complexe de la transcription de l'ARNm d'EphA7 (épissage alternatif) (Ciossek et al., 1995; Valenzuela et al., 1995).

Le rôle physiologique de MDK1 Δ 1 et MDK1 Δ 2 reste nébuleux. Concernant les isoformes dépourvues du domaine kinase, Ciossek et al ont proposé qu'elles agiraient comme des inhibiteurs dominants négatifs, en se liant à l'isoforme EphA7-FL afin de réprimer son activation en empêchant sa dimérisation (Ciossek et al., 1999). Au-delà de cette hypothèse, il a aussi été suggéré que ces isoformes EphA7 tronquées co-localiseraient avec EphA7-FL dans la cellule afin de réguler les taux d'expression des ligands environnant la cellule (Mori et al., 1995). Une autre possibilité serait que ces molécules tronquées, dépourvues de domaine kinase pourraient néanmoins jouer le rôle de molécules de signalisation de par leur liaison à d'autres ligands (Zhou, 1998). Par exemple, on a observé que la liaison de l'éphrine-A5 à EphA7-FL non agglomérée résultait en une répulsion des cellules portant respectivement le récepteur ou le ligand, alors que dans le cas où l'éphrine-A5 se liait à des complexes agglomérés de EphA7-FL/EphA7-T1 ou -T2, les deux cellules engagées dans ce processus s'attiraient (Frisen et al., 1999).

2.5.2. Distribution d'EphA7 dans le SNC

L'isoforme pleine longueur d'EphA7 est fortement exprimée dès le début du développement du SNC alors que les autres isoformes, notamment EphA7-T1 et EphA7-T2, sont exprimés de manière progressive (Ciossek et al., 1995; Valenzuela et al., 1995).

Dans le SNC en développement, l'hybridation *in situ* a permis d'analyser la distribution de l'ARNm d'EphA7. Les niveaux d'expression les plus forts ont été détectés dans l'épithalamus, le thalamus, le corps mamillaire de l'hypothalamus,

l'hippocampe en devenir et le gyrus dentelé. Par contre, le caudé-putamen montre un plus faible niveau d'expression. EphA7 est aussi exprimé au cours du développement du cervelet. Cependant, dans le colliculus supérieur, l'ARNm d'EphA7 n'est pas détectable avant les derniers stades du développement. De plus, chez les embryons E12.5, l'expression d'EphA7 est détectable dans le cortex (frontal, cingulaire) et à E16.5 dans le cortex néopallial ainsi que la zone sous-ventriculaire (ZSV). À E18.5, on peut détecter l'expression d'EphA7 dans le cortex pyriforme. Par ailleurs, EphA7 est exprimé dans les pons ainsi que la medulla, avec un très fort signal dans l'olive inférieure. À partir d'E14.5 l'organe sous-commissural devient la région ayant le plus fort niveau d'expression d'EphA7. L'analyse des embryons de 16.5 jours p.c. (post-coït) a montré que l'ARNm d'EphA7 était également transcrit dans le striatum et le noyau septal (Ciossek et al., 1995; Mori et al., 1995; Valenzuela et al., 1995).

Lorsque ces mêmes études portant sur la distribution d'EphA7 ont été menées en utilisant le RAPIS (« *Receptor affinity probe in situ staining* »), Rogers et al (1999b) se sont rendu compte qu'outre les régions énumérées ci-dessus, EphA7 pouvait être détecté dans d'autres régions du cerveau lors du développement telles que la capsule interne, le noyau mésencéphalique trigéminal, le tectum antérieur, les noyaux trigéminaux.

Dans le cerveau adulte, l'expression d'EphA7 a également été cartographiée, montrant une distribution beaucoup plus restreinte. Il est vrai qu'EphA7 est transcrit très faiblement de manière générale, néanmoins certaines régions à l'instar du caudé-putamen, du cortex (notamment granulaire et pyriforme), de l'habenula, noyau mammillaire, noyau olfactif antérieur et la couche des cellules de Purkinje du cervelet

présentent une très forte expression d'EphA7. Il en est de même pour la couche des cellules pyramidales de l'hippocampe (CA1, CA2 et CA3), les neurones du gyrus dentelé (cellules granulaires, neurones de la couche polymorphe) et l'organe sous-commissural. De faibles niveaux d'expression sont détectés ailleurs dans le cerveau adulte (Ciossek et al., 1995; Valenzuela et al., 1995).

Concernant la protéine EphA7, Ciossek et al (1999) ont examiné sa distribution dans le cerveau en faisant la distinction entre les isoformes de pleine longueur EphA7-FL qu'ils ont appelé EphA7-TK+ (pour EphA7 ayant un domaine kinase) et les isoformes tronquées dépourvues de domaine kinase EphA7-T1 et EphA7-T2 (regroupés sous le nom d'EphA7-TK-). Tout d'abord, ils ont rapporté qu'au cours du développement, EphA7-TK- n'était pas détectable, mais que chez l'adulte, il était localisé dans les corps cellulaires et les dendrites proximales de certains neurones tels que les cellules pyramidales du cortex moteur, du cortex piriforme et de l'hippocampe, les cellules de Purkinje du cervelet ainsi que les neurones trigéminaux du mésencéphale. D'autres structures comme les noyaux profonds du cervelet et le noyau accumbens montraient également une forte immunoréactivité anti-EphA7-TK-. Par opposition, EphA7-TK+ était détecté essentiellement dans le neuropile (couche dépourvue de corps cellulaires) de l'hippocampe, du cortex, du striatum ainsi que dans l'hypothalamus et la substance noire réticulée (SNR) (Ciossek et al., 1999).

2.5.3. Rôles d'EphA7 dans le développement du SNC

2.5.3.1. Détermination de la taille du cerveau

Durant les premiers évènements du développement du cerveau, on assiste à l'élimination intensive par apoptose des cellules souches neurales, ce qui détermine le volume approprié de la population des progéniteurs neuraux influençant ainsi la taille du cerveau (de la Rosa and de Pablo, 2000; Kuan et al., 2000; Yeo and Gautier, 2004). Dans la perspective de comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la régulation du nombre de cellules progénitrices au cours du développement, Park et al ont étudié l'implication de la signalisation d'EphA7/éphrine-A5 dans l'apoptose de certaines régions spécifiques du cerveau. Ainsi, ils ont rapporté tout d'abord que le récepteur EphA7 et l'éphrine-A5 étaient exprimés de façon simultanée au niveau de la ligne médiane dorsale du diencephale et du mésencéphale antérieur. Par ailleurs, les embryons éphrine-A5^{-/-}/éphrine-A2^{-/-} montraient une réduction de la mort programmée des cellules épithéliales neurales. Par contre lorsqu'on active EphA7 *in vivo* par l'éphrine-A5, on assiste à l'apoptose des cellules exprimant le récepteur EphA7, ce qui n'est pas le cas chez les animaux éphrine-A5^{-/-}. Les auteurs ont conclu que la mort programmée des cellules progénitrices neurales se déroulerait de manière spécifique dans les régions du cerveau où le récepteur EphA7 avoisinerait l'éphrine-A5 (Park et al., 2013).

Plus spécifiquement, il a été démontré que la détermination de la taille du cortex est également sous l'influence de la signalisation EphA7/éphrine-A5. EphA7 est exprimé préférentiellement dans les progéniteurs corticaux alors que l'éphrine-A5 est

localisée dans les progéniteurs du télencéphale ventral et dorsal médian, ceci en gradients complémentaires. En utilisant les méthodes de gain et de perte de fonction, les auteurs ont montré que l'activation ectopique de l'éphrine-A5 dans les progéniteurs corticaux exprimant EphA7 résulte en une vague d'apoptose de ces cellules. Inversement, la manipulation du gène EphA7 cause une réduction de l'apoptose, ce qui provoque une augmentation de la taille du cortex (Fig. 6). Ce dernier événement peut aboutir dans le cas extrême à des exencéphalies. En effet, chez les embryons EphA7^{-/-}, la mort des progéniteurs corticaux se produit deux fois moins que la normale. Ces animaux montrent également une augmentation significative (20%) de la taille du cortex. De plus, dans 10% des cas, les embryons EphA7^{-/-} présentent un développement exencéphalique du cerveau (Depaepe et al., 2005).

Par ailleurs, le contrôle de la taille du cerveau mené par EphA7 à travers la régulation de l'apoptose des progéniteurs neuronaux est un événement qui dépend des caspases (Depaepe et al., 2005; Park et al., 2013). Une étude récente s'est penchée sur l'identification des molécules auxquelles se liait EphA7 lors de sa fonction apoptotique. Ainsi, les auteurs ont rapporté que la stimulation du récepteur EphA7 par l'éphrine-A5 activait la voie de signalisation TNFR1 (« *Tumor Necrosis Factor Receptor* »). Aussi, il y avait une association physique entre le complexe éphrine-A5/EphA7 et TNFR1 à la surface de la cellule. D'autre part, les auteurs ont montré qu'EphA7-FL était l'isoforme d'EphA7 impliquée dans ce processus (Lee et al., 2013a). Cette étude sur la signalisation renseigne certes sur le mécanisme potentiel mais pas définitif du contrôle de l'apoptose régulée par EphA7 dans le SNC, vue qu'elle a été menée *in vitro* sur les cellules HEK293 (« *Human embryonic kidney 293*

cells ») qui ont été transfectées avec des doses plus ou moins normales d'EphA7. Ce qui fait qu'on n'est toujours pas réellement renseigné sur ce qui se passe *in vivo* dans les neurones.

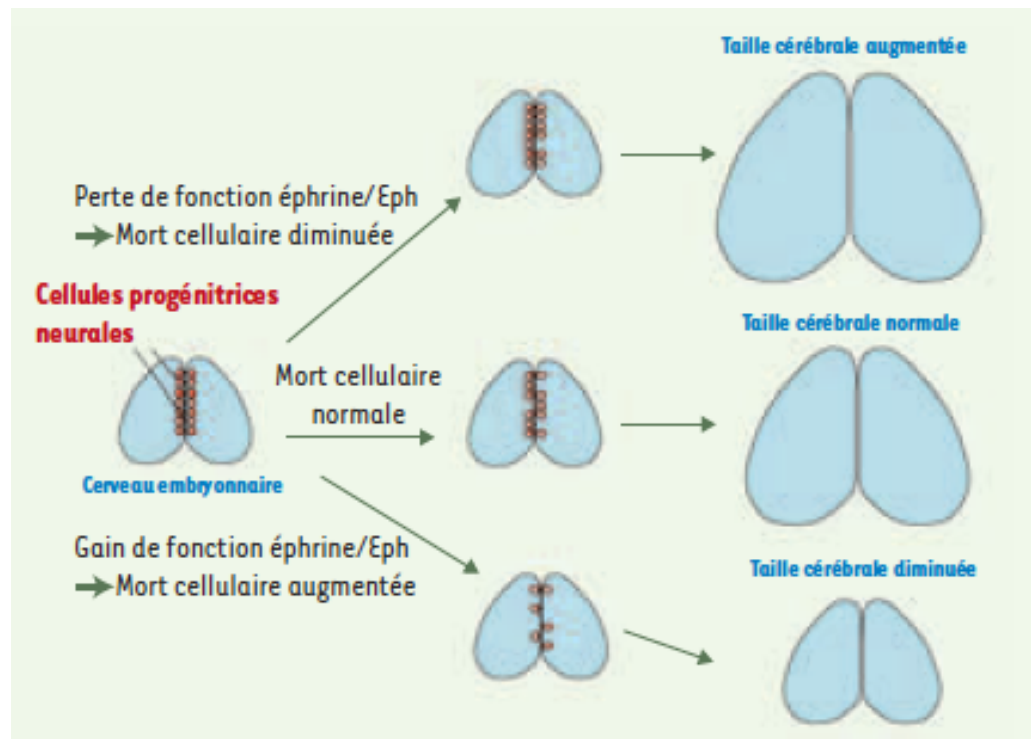


Figure 6 : Implication d'EphA7 dans la détermination de la taille du cerveau

Les cellules progénitrices neurales (en rouge) sont à l'origine de l'ensemble des neurones engendrés au cours du développement cérébral. Une certaine proportion de ces cellules meurt par apoptose, notamment sous l'effet des signaux éphrine/Eph. En cas de gain de fonction de la voie éphrine/Eph, la mort cellulaire des progéniteurs est augmentée, causant une déplétion des progéniteurs, il en résulte une diminution de la taille cérébrale à la naissance. En cas de perte de fonction de la voie éphrine/Eph, la

mort cellulaire des progéniteurs est diminuée, avec pour résultat, une augmentation de la taille du cerveau. (Tirée de Depaepe and Vanderhaegen, 2005).

2.5.3.2. Fermeture du tube neural

Au cours de l'embryogenèse, la fermeture du tube neural constitue un évènement primordial pour la morphogenèse du cerveau. Ce processus est sous le contrôle des interactions éphrine-A5/EphA7. En effet, l'analyse des embryons éphrine-A5^{-/-} a montré un échec de la fermeture du tube neural chez ces derniers résultant en des malformations cranio-faciales (environ 17% des embryons) et dans les cas extrêmes en l'absence de cerveau (anencéphalies). Ces animaux meurent à leur naissance. Aussi bien l'hybridation *in situ* chez les embryons E8 à E9 que la RT-PCR («*Polymerase chain reaction with reverse transcription*») ont montré l'expression extensive des ARNm de l'éphrine-A5 et du récepteur EphA7 respectivement au niveau des crêtes neurales de la ligne médiane dorsale du crâne avant et au moment de la fermeture du tube neural. Cela explique le fait que les défauts de la fermeture du tube neural se localisent à cet endroit. Afin de mieux comprendre par quel moyen l'éphrine-A5 qui est notamment connue pour son rôle répulsif (Frisen et al., 1998) pouvait contrôler la fusion du tube neural en se liant au récepteur EphA7, des tests d'adhésion ont été faits *in vitro*. Les auteurs ont rapporté que les cellules provenant des extrémités des crêtes neurales du crâne des animaux éphrine-A5^{+/-} contrairement à celles des animaux éphrine-A5^{-/-} adhèrent plus aux surfaces recouvertes par EphA7-Fc.

Par la suite, ces mêmes auteurs ont identifié l'isoforme d'EphA7 nécessaire à la fermeture du tube neural. Dans un premier test, ils ont exprimé EphA7-FL dans les

cellules HEK293 et ont remarqué qu'en présence des cellules exprimant l'éphrine-A5-Fc, il s'établissait une répulsion. Des tests identiques ont porté sur EphA7-T1 et le mélange EphA7-FL+EphA7-T1 qui contrairement au cas précédent, lorsqu'ils étaient exprimés dans des cellules placées en présence d'éphrine-A5-Fc entraînait l'adhésion de ces dernières. Les auteurs ont ainsi montré qu'au cours de la fermeture du tube neural, la présence d'éphrine-A5, d'EphA7-FL et d'EphA7-T1 était nécessaire avec d'EphA7-T1 ayant pour rôle la diminution de la phosphorylation d'EphA7-FL (Holmberg et al., 2000).

Récemment, une étude similaire a corroboré les résultats précédents de l'implication de la signalisation de l'éphrine-A5 et EphA7 dans la fermeture du tube neural. Par ailleurs, la voie en amont qui activait l'adhésion cellulaire contrôlée par éphrine-A5/EphA7 a été identifiée, il s'agit de la voie Dlx5/Msx2. Dlx (« *distal-less homeobox* ») et Msx (« *msh-like homeobox* ») sont respectivement des activateurs et répresseurs de la transcription largement étudiés pour leurs implications dans la neurulation. En effet, les mutants Dlx5/Msx2 présentent une malformation du tube neural crânial (Lee et al., 2013b), rappelant le phénotype des animaux éphrine-A5^{-/-} (Holmberg et al., 2000). De plus l'expression de l'éphrine-A5 et EphA7-T1 mais pas EphA7-FL était diminuée chez les embryons mutants Dlx5/Msx2, notamment dans la région dorsale du tube neural, traduisant un échec de la fusion des crêtes neurales (Lee et al., 2013b).

2.5.3.3. Guidage axonal

Quelques-unes des fonctions les plus étudiées des Eph/éphrines est le ciblage topographique et le guidage axonal qui dépendent généralement de leurs gradients d'expression complémentaires. EphA7 ne déroge pas à cette fonction.

Le striatum est une région anatomique non seulement très importante mais aussi très organisée. Il est généralement subdivisé en deux (2) compartiments à savoir le striosome (domaine des récepteurs cholinergiques muscariniques et μ -opioïde) et la matrice (contenant les neurones GABAergiques et EphA4). Soulignons que l'organisation de ces différents compartiments se détermine entre la vie embryonnaire E20 et la postnatale P10. Une étude récente en hybridation *in situ* et immunohistochimie a permis l'identification d'un compartiment additionnel constitué de neurones exprimant l'ARNm d'EphA7. Ce compartiment néo-identifié aurait la même organisation que celle du « matrisome » et serait confiné à la partie dorsale du striatum (Tai et al., 2013).

Outre le striatum, l'expression d'EphA7 et de l'éphrine-A5 en gradients complémentaires respectivement dans le néocortex et les noyaux profonds du thalamus est déterminante pour la formation de ces deux régions anatomiques (Torii and Levitt, 2005). Le néocortex est relié aux noyaux thalamiques par des projections cortico-thalamiques ou CT, il en est de même pour les noyaux thalamiques qui envoient leurs axones thalamo-corticaux ou TC dans le néocortex. En utilisant des techniques de transfert génétique d'électroporation *in utero* sur des embryons E12.5, il a été montré que le récepteur EphA7 était nécessaire pour la projection adéquate des axones du

néocortex dans le thalamus (Fig. 7). En effet, l'électroporation *in utéro* a permis de perturber le gradient d'expression d'EphA7 sélectivement dans le néocortex. Ceci étant, les auteurs ont reporté que la surexpression d'EphA7 empêchait les projections CT d'atteindre adéquatement leur cible. Par contre lorsque l'expression d'EphA7 se trouvait diminuée, les axones TC ne voyaient leurs parcours ni intra, ni inter-régional dérangé. Il en découle de toutes ces observations la conclusion qu'un motif d'expression en gradient d'EphA7 constitue un régulateur critique pour le ciblage topographique des axones CT dans les noyaux profonds du thalamus (Torii and Levitt, 2005; Tai and Kromer, 2014). Ainsi, l'importance de la présence du récepteur EphA7 pour le bon développement des projections CT étant un fait établi, les mêmes auteurs se sont par la suite intéressés à son impact précis sur l'étape du développement de ces axones CT. Toujours par la technique d'électroporation *in utéro*, ils ont montré que les processus de développement sont coordonnés entre autres par le motif d'expression complémentaire d'EphA7 localisé dans les axones CT et des autres éphrines-A, notamment l'éphrine-A5 se situant dans les noyaux thalamiques (Torii et al., 2013).

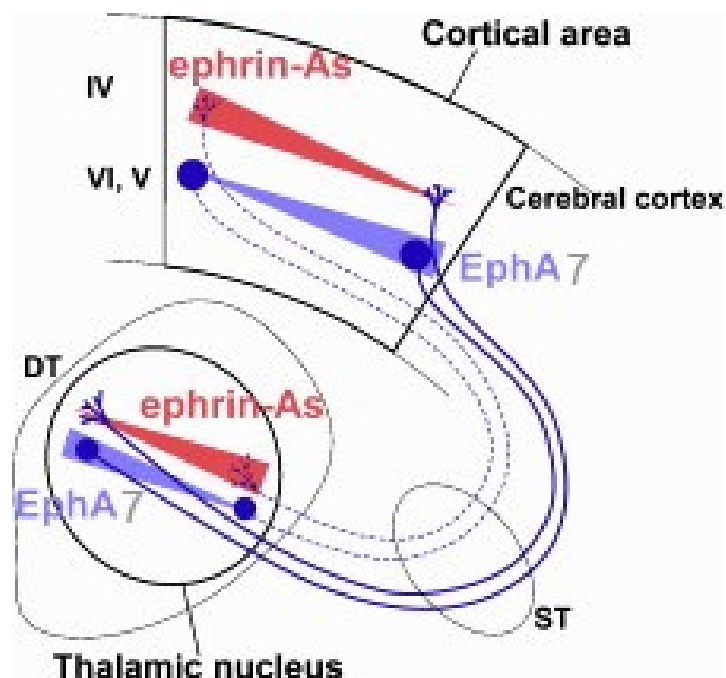


Figure 7 : Modèle descriptif du contrôle de l'organisation réciproque des projections cortico-thalamiques et thalamo-corticales par le récepteur EphA7 et les éphrines-A (notamment l'éphrine-A5).

EphA7 et l'éphrine-A5 sont exprimés en gradients complémentaires (triangles bleus et rouges respectivement) au sein et entre des régions spécifiques du néocortex et leurs cibles thalamiques. Les axones thalamo-corticaux et cortico-thalamiques montrant une expression d'EphA7 élevée (ligne pleine) ou faible (ligne discontinue) projettent aux domaines montrant de faible ou fort niveaux d'expression d'éphrine-A5 respectivement dans leurs cibles réciproques (Reproduite et modifiée avec permission, de Torii and Levitt, 2005).

En synergie avec les études précitées, il a été aussi montré que l'établissement des projections cortico-striatales du cortex somatosensoriel primaire (S1) au striatum

dorso-latéral dépend des interactions répulsives éphrine-A5/EphA7. Par l'intermédiaire des techniques d'injection antérograde et rétrograde avec le traceur BDA («*Biotinylated dextran amine*»), les auteurs ont pu déterminer que les axones provenant de l'aire S1 du cortex et exprimant l'éphrine-A5 évitent les régions du striatum qui expriment fortement le récepteur EphA7. Par contre, ces neurones ont une préférence pour les régions striatales pauvres en EphA7. C'est de cette manière que s'établirait la connexion cortex somatosensoriel/striatum (Tai and Kromer, 2014).

L'établissement des projections rétino-topiques dans le tectum et le colliculus constitue le modèle de cartographie topographique le plus étudié. De manière générale, il a été montré que les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) nasales projettent au tectum/colliculus ventral et les CGR temporales au tectum /colliculus dorsal. La démonstration de l'expression des Eph et éphrines en gradients opposés que ce soient dans la rétine ou le tectum/colliculus a permis de montrer que ces molécules fournissent l'information positionnelle qui guide les mouvements topographiques des cônes de croissance dans le système visuel (Scalia et al., 2009; Scicolone et al., 2009). Parmi la multitude de ces molécules exprimées de part et d'autre du système visuel, EphA7 a été démontré avoir une grande importance dans l'établissement des projections rétino-colliculaires (Fig. 8). Ceci a été confirmé par l'utilisation des souris EphA7^{-/-} chez lesquelles l'analyse de la rétine par l'intermédiaire des traceurs antérogades et rétrogrades a révélé un défaut de ciblage topographique des axones de la partie nasale de la rétine (Rashid et al., 2005).

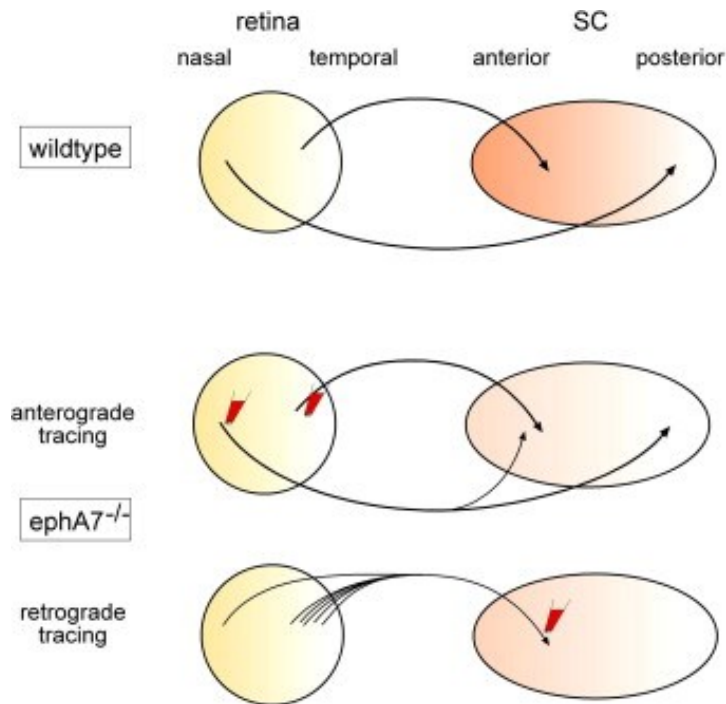


Figure 8 : Défauts de ciblage topographique des axones de la rétine nasale chez les animaux *EphA7*^{-/-}.

Chez les animaux de type sauvage, les axones de la rétine temporale et nasale projettent au colliculus antérieur et postérieur respectivement. Les animaux *EphA7*^{-/-} ont été analysés par des techniques de transport antérograde et rétrograde. Le traçage antérograde a montré une projection des axones temporaux au colliculus antérieur alors que les axones nasaux ont été retrouvés aussi bien dans le colliculus postérieur qu'antérieur. La technique de transport rétrograde a montré que l'injection des microsphères fluorescentes dans le colliculus antérieur résulte en un marquage des cellules ganglionnaires rétinales (CGR) dans la partie nasale et temporale de la rétine. De plus, on a remarqué un élargissement de la surface occupée par les CGR dans la partie temporale. (Reproduite avec permission, de Rashid et al, 2005).

2.5.4. Rôles d'EphA7 dans le SNC adulte

Parler des rôles d'EphA7 chez l'adulte est un euphémisme dans le sens où rares sont les études ayant investigué leur fonction dans le SNC adulte.

Néanmoins, à l'instar de ses homologues, EphA7 a été impliqué dans la régulation négative de la prolifération des progéniteurs neuraux et de la neurogenèse adulte, ceci à travers la signalisation inverse de l'éphrine-A2. Lors de l'embryogenèse, EphA7 est un des premiers récepteurs Eph à être exprimé dans la ZSV (la ZSV constitue avec la zone sous-granulaire ou ZSG les régions de neurogenèse adulte (Altman, 1969; Deng et al., 2010; Ming and Song, 2011)). Sa présence est détectable dès E12.5. Chez la souris adulte, on note une expression en gradients complémentaires d'EphA7 et éphrine-A2 dans les cellules constituant les murs de la ZSV. L'analyse plus poussée de ces cellules a montré que les cellules immunopositives EphA7 exprimaient également la nestine qui est un marqueur des cellules souches neurales. Par ailleurs, EphA7 était aussi détectable dans les cellules épendymaires et un sous-type d'astrocytes qui sont tous de potentielles cellules souches neurales. Par contre, l'éphrine-A2 est exprimée uniquement par les cellules progénitrices neurales et les neuroblastes. L'injection via une pompe osmotique d'éphrine-A2-Fc et EphA7-Fc dans les ventricules latéraux des souris adultes de lignées sauvages résulte en une augmentation des cellules marquées par le BrdU (bromo-deoxyuridine) dans les murs des ventricules. Le BrdU est un marqueur des cellules en division. Ensuite, l'analyse des animaux éphrine-A2^{-/-} et EphA7^{-/-} a montré également une augmentation du nombre de cellules BrdU dans les ventricules latéraux. De l'augmentation de cellules BrdU s'en suit une augmentation de neurones néoformés notamment dans le bulbe

olfactif des animaux examinés. Prises ensemble, ces données suggèrent qu'EphA7 ainsi que l'éphrine-A2 seraient des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. La RT-PCR, l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie ont révélées l'expression d'EphA7-FL et EphA7-T1 dans toutes les cellules épendymaires des murs des ventricules latéraux. La présence d'EphA7-T1 dépourvue de domaine kinase et agissant comme un ligand suscite la possibilité d'une signalisation inverse d'éphrine-A2. Pour tester cette hypothèse, des rétrovirus exprimant EphA7-T1 et la GFP (« *Green fluorescent protein* ») ainsi que des rétrovirus témoins n'exprimant que la GFP ont été utilisés. La surexpression de ces rétrovirus dans les neurosphères provenant des souris de lignées sauvages et EphA7^{-/-} a induit une diminution significative de la prolifération, ce qui n'est pas le cas des cellules infectées par le rétrovirus témoin. L'expression d'EphA7-T1 provoque un effet contraire à celui de la perte du récepteur (animaux EphA7^{-/-}). Cela suggère ainsi que l'inhibition de la prolifération ne peut être basée sur la signalisation antérograde d'EphA7 donc forcément elle doit être plutôt dépendante de la signalisation inverse de l'éphrine-A2. Dans la foulée, on peut aussi noter la nécessité de la présence d'EphA7-T1 et éphrine-A2 pour inhiber la prolifération des cellules souches neurales chez l'adulte (Holmberg et al., 2005).

Une autre étude a investigué le rôle de l'inhibition de l'expression d'EphA7 dans un modèle de lésion de la moelle épinière. Les auteurs ont montré que sept (7) jours après la lésion, il survient une augmentation de l'expression de l'ARNm d'EphA7-FL. De plus, l'inhibition de cette surexpression en utilisant des oligonucléotides antisens a provoqué une réduction de l'apoptose des neurones et astrocytes réactifs de la matière blanche. Cette inhibition a résulté après une semaine en

une amélioration des déficits locomoteurs chez les animaux ayant subi la lésion de la moelle épinière (Figuerola et al., 2006).

3. Hypothèses et objectifs

Notre intérêt pour le récepteur EphA7 se justifie d'une part par sa très forte expression au cours de l'embryogenèse et plus particulièrement pendant le développement du SNC chez les vertébrés, du poisson à l'humain, et d'autre part par la grande variété de rôles que joue ce récepteur au cours de la vie prénatale. Chez l'adulte, rares sont les études ayant investigué le rôle du récepteur EphA7 et aucune d'entre elles n'a analysé son motif d'expression subcellulaire par microscopie électronique dans le cerveau adulte.

En se référant à son rôle durant le développement et aussi les études portant sur les rôles de ses homologues chez l'adulte, nous avons émis l'hypothèse d'une implication du récepteur EphA7 dans des processus de plasticité synaptique dans le cerveau mature.

Dans cette optique, on pourrait s'attendre à ce que la localisation cellulaire et subcellulaire du récepteur EphA7 soit compatible avec de telles fonctions dans le cerveau des rongeurs adultes. Par exemple, sa localisation au niveau des densités pré- ou post-synaptiques des synapses, ou des prolongements astrocytaires, devrait nous éclairer sur la manière dont ce récepteur intervient dans la plasticité synaptique ou le maintien des synapses dans les différentes sous-régions de l'hippocampe (CA1, CA3, DG) ainsi que du cervelet.

L'objectif de ce projet d'étude consistait à examiner la distribution régionale d'EphA7 dans le cerveau des rongeurs adultes, par hybridation *in situ* et immunohistochimie. Étant une protéine membranaire impliquée dans les interactions

intercellulaires de surface, sa localisation subcellulaire dans l'hippocampe et le cervelet par immunohistochimie en microscopie électronique était nécessaire pour découvrir ses sites d'action et les distinguer des sites intracellulaires de sa synthèse ou de son transport. Après cette analyse qualitative, il était aussi question pour nous de faire une quantification des éléments immunopositifs d'une part et immunonégatifs d'autre part afin de déterminer s'il y avait une localisation préférentielle d'EphA7 et si cela était dépendant de la sous-région ou même de la couche analysée.

Chapitre 2.

Regional Expression of EphA7 in Rodent Brain and Ultrastructural Localization in Hippocampus and Cerebellum of Adult Rat

Article en préparation

Ma contribution à cette étude a été la mise au point du protocole d'immunoperoxydase ainsi que la réalisation des expériences d'immunohistochimie en microscopie photonique, la préparation du matériel pour la microscopie électronique, l'analyse qualitative et quantitative des images de microscopie électronique, la rédaction de la première version du manuscrit et la préparation des figures, et la collaboration aux versions subséquentes. Au total, ma contribution correspond à 60-70% du travail publié dans le manuscrit.

Regional Expression of EphA7 in Rodent Brain and Ultrastructural Localization in Hippocampus and Cerebellum of Adult Rat

Clara A. Amegandjin¹, Wafaa Jammow¹, Sylvie Laforest², Mustapha Riad¹, Moogeh Baharnoori¹, Frédérique Badeaux³, Luc DesGroseillers³, Elena B. Pasquale^{4,5}, Guy Drolet², and Guy Doucet^{1*}.

¹Département de neurosciences and Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

²Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL), Québec, Québec, Canada G1V 4G2

³Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

⁴The Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, California 92037

⁵Pathology Department, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093

INDEXING TERMS: Eph receptor, adult, hippocampus, cerebellum, dendritic spines, dendrites, synapses, ultrastructure.

* Correspondence to: Guy Doucet, Département de neurosciences and Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

ABSTRACT

EphA7 is widely expressed and plays several roles in the developing central nervous system (CNS). It remains present in the adult, where its roles are yet ill defined. We mapped its distribution in adult rat CNS using *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IHC) in light and electron microscopy (EM). By ISH, the strongest signal was observed in the hippocampal pyramidal and granule cell layers. Moderate levels were detected in the habenula, striatum, amygdala, the cingulate, piriform and entorhinal cortex, and in the cerebellum, notably Purkinje cells. By IHC, the general distribution was consistent with ISH results, considering the transport of the EphA7 protein to neuronal processes, as exemplified in the strongly labeled neuropil layers and weakly stained pyramidal and granule cell layers. In contrast, in the cerebellum, the protein remained largely in the Purkinje cell bodies. By EM, EphA7 was localized essentially in the post-synaptic densities (PSDs) of synapses in dendritic spines and dendrites in hippocampus. Immunopositive axon terminals, axons and astrocytic leaflets were also observed. In the cerebellum, EphA7 immunoreactivity was prominent in Purkinje cell somata, with much weaker staining in the granule and molecular layers. Ultrastructural examination showed EphA7 mostly intracellular within Purkinje cell somata, associated with the synthetic and trafficking organelles. The granule and molecular layers showed immunostaining mainly in dendritic spine PSDs and in some axon terminals. The dual preferential cell surface localization of EphA7 in dendrite and dendritic spine PSDs of the adult rat hippocampus and cerebellum provides morphologic evidence that EphA7 plays a key role in adult CNS synaptic maintenance, plasticity, or function.

INTRODUCTION

EphA7 is a member of the Eph receptor tyrosine kinases. Together with their ephrin ligands, they are important mediators of cell-cell communication regulating cell attachment and motility (Himanen and Nikolov, 2003). They mediate bi-directional signalling, both being membrane proteins. In mammals, there are 9 EphA receptors (EphA1-8, and 10) and 5 EphB receptors (EphB1-4, and 6) that promiscuously bind either the 5 ephrin-As (ephrin-A1-5), or 3 ephrin-Bs (ephrinB1-3), respectively (Egea and Klein, 2007; Lisabeth et al., 2013). Exceptions to this subclass selectivity are EphA4 and EphB2 that can also bind ephrins of other class (Gale et al., 1996; Himanen et al., 2004; Pasquale, 2004). Ephrin-As are attached to the cell surface by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and thus require a transmembrane co-receptor for signalling (Lim et al., 2008; Marler et al., 2008; Marler et al., 2010), whereas ephrin-Bs are transmembrane proteins capable of signal transduction (Kullander and Klein, 2002). During central nervous system (CNS) development, Eph-ephrin interactions have been implicated in cell segregation leading to segmentation of hindbrain (rhombomeres) and forebrain, guidance of cell migration, axonal guidance and topographic mapping in various systems (including the olfactory, visual and thalamocortical systems) (Klein, 2004; Palmer and Klein, 2003).

Concerning EphA7 more specifically, it has been shown that its interactions with ephrin-A5 are implicated in neural tube closure (Holmberg et al., 2000; Lee et al., 2013b). Such interactions were also reported to control brain size through the regulation of neural progenitor apoptosis (Depaepe et al., 2005), involving TNFR1 activation, resulting in a caspase-dependant apoptotic cell death (Lee et al., 2013a).

Many Eph receptors and ephrins are still expressed in the adult brain (Yamaguchi and Pasquale, 2004), where they have been implicated in neurogenesis (Ashton et al., 2012; Jing et al., 2012), the hindrance of axonal regeneration (Figuerola et al., 2006; Goldshmit et al., 2006; Palmer and Klein, 2003), or the regulation of dendritic spine morphology, in hippocampus (Yamaguchi and Pasquale, 2004). In cerebellum, Eph-ephrin interactions were also reported to regulate spinogenesis in the proximal dendritic domain of the Purkinje cells (Cesa et al., 2011). Their implication in synaptogenesis and synaptic plasticity, notably in hippocampus, has been extensively described (Contractor et al., 2002; Martinez et al., 2005). It has also been demonstrated that Eph receptor and ephrin interactions regulate gliotransmitter release (Nestor et al., 2007; Zhuang et al., 2011).

The regional expression of EphA7 as revealed by *in situ* hybridization and immunohistochemistry has previously been reported in developing and adult CNS (Ciossek et al., 1995; Ciossek et al., 1999; Rogers et al., 1999). But, to date, there has been no electron microscopic study of EphA7 sub-cellular localization in adult CNS. Using a purified EphA7 polyclonal-antibody raised against the last 105 amino-acids of the SAM-domain + PDZ motif, in fusion with Glutathion S-Transferase (GST) and detecting selectively the full-length isoform of EphA7, we investigated the regional, layer-specific and sub-cellular distribution of EphA7 in CA1, CA3, and dentate gyrus (DG) of the dorsal hippocampal formation and of the cerebellar cortex in adult rat. As expected, EphA7 cellular and sub-cellular localizations are in line with roles in synaptic function, maintenance or plasticity.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All procedures were conducted in strict accordance with the Guide to the care and use of experimental animals of the Canadian Council for Animal Care (CCAC) and approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal (*Comité de déontologie de l'expérimentation animale*, CDEA). The animals were housed at constant temperature (21°C) and humidity (60%) under a fixed 12-hour light/dark cycle and with free access to food and water. *In situ* hybridization was carried out on tissues from 2 adult C57BL/6 mice (20-25 g) and 3 adult male Sprague-Dawley rats (250-300g, Charles River, St Constant, Québec, Canada). Immunohistochemistry was carried out on brain sections from 3 adult male Sprague-Dawley rats (250-300 g, Charles River). Three EphA7 KO (EphA7^{-/-}; JAX Mice, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) and 4 wild-type mice (Charles River), 20-25 g, were used to assess the specificity of the anti-EphA7 antibody.

The animals were deeply anaesthetized with a cocktail containing ketamine hydrochloride (Vetalar, Bioniche, Belleville, ON; 80 mg/kg) and xylazine (Xylamax, Biomeda-MTC Animal Care Inc., Cambridge, ON; 10 mg/kg).

For *in situ* hybridization, they were then perfused transcardially with a solution of 4% paraformaldehyde (PFA) in borax buffer (0.1M sodium tetraborate, pH 9.5). These brains were immersed in 20 % sucrose/4 % PFA/borax cocktail at 4 °C, then frozen and kept at -80 °C until 30 µm-thick coronal sections were cut with a cryomicrotome (Leica SM2400 Sledge Microtome).

For immunohistochemistry, the animals were perfused with 0.1M sodium phosphate buffered saline (PBS, 0.9% NaCl in 50 mM PB 0.2M, pH 7.4) followed by 4% PLP (periodate-lysine-paraformaldehyde) in 0.1M phosphate buffer (McLean and Nakane, 1974). Following perfusion, the brains were further fixed for 1h at 4 °C in PLP and washed in PBS. Transverse 40 µm-thick sections were cut in ice-cooled PBS with a Vibratome (Leica, VT1000S). They were stored at -20 °C in antifreeze solution (40% PB, 0.2M, 30% ethylene glycol, 30% glycerol), until used.

***In situ* hybridization**

EphA7 mRNA expression was detected by using a 487-bp fragment containing nt 401-888 (NM_001122889.1) which specifically corresponded to EphA7 gene exon 3 (GENE ID: 13841 EphA7). This fragment encoded for the EphA7 extracellular domain (Fig. 1B; AA 55-217). Therefore, the antisense riboprobe detected all EphA7 isoforms. The fragment was inserted in opposite orientations in pBluescript II SK⁺/− plasmids. The two plasmids containing the cDNA fragment were linearized by the appropriate restriction enzyme (Not-I for the sense riboprobe and Hind III for the antisense riboprobe). Thereafter ³⁵S-UTP-labeled sense or antisense riboprobes were transcribed using T7 or T3 polymerase, respectively, for antisense and sense riboprobes.

The protocol used for *in situ* hybridization and autoradiography of the mRNA signal was previously described (Mansi et al., 2000; Mougnot et al., 2007).

Anti-EphA7 polyclonal antibody

The polyclonal anti-EphA7 antibody was raised in rabbit against a peptide corresponding to the last 105 amino-acids of the intracellular portion of mouse EphA7 (SAM domain +PDZ motif) in fusion with Glutathion S-Transferase (GST). Thus, this anti-EphA7 antibody does not recognize the truncated T1 and T2 isoforms, and is considered selective for the full-length isoform of this receptor (Fig. 1A). Antibody specificity controls for immunochemistry included comparing EphA7-immunolabeling with *in situ* hybridization for EphA7 mRNA, as well as parallel processing of sections from EphA7^{-/-} and WT mice for immunochemistry.

Immunohistochemistry

Sections were processed freely floating, following an immunoperoxidase protocol. Briefly, sections were rinsed in PBS, followed by a 1h pre-incubation at 22 °C in a protein blocking solution (Expose Rabbit-Specific HRP/DAB detection IHC Kit, Abcam, Cambridge, UK, # ab80437), with 0.3% Triton-X100 for light microscopy only. Then, the sections were incubated for 48 h at 4 °C in 2.5 µg/ml of the anti-EphA7 antibody in PBS containing 1% normal goat serum (NGS) (plus 0.3% Triton X-100, for light microscopy).

After rinsing, the sections were incubated during 45 min at 22 °C in goat anti-rabbit HRP conjugate (from the Abcam kit), rinsed, and reacted with hydrogen peroxide in the presence of diaminobenzidine (DAB Chromogen, Abcam Kit). Sections for light microscopy were mounted on microscopes slides, and coverslipped with Permount (Fisher, Fair lawn, NJ). Light microscope micrographs were taken with a

Leica Diaplan microscope with Plan Apo objectives and an Olympus DP21 digital camera. Images were adjusted for brightness and contrast with Adobe Photoshop (CS6).

Sections for EM were thereafter processed as previously described (Tremblay et al., 2007). Areas of interest from the dorsal hippocampal formation (CA1, CA3, DG) and cerebellar cortex were excised from the resin- (Durcupan ACM, Fluka, Sigma) embedded sections and glued to the tip of pre-polymerized resin blocks. Ultrathin (50-70 nm) sections were cut with an ultramicrotome (Reichert Ultracut S; Leica, Wetzlar, Deutschland), collected on bare 150 square-mesh copper grids (Electron Microscopy Sciences, Hatfield PA), stained with lead citrate, and examined at 60 kV with a Philips CM100 electron microscope, equipped with an 8MB digital camera (AMT XR80).

Quantitative analyses

Electron microscopic examination was carried out on ultrathin sections from the hippocampus and cerebellum of 3 rats. Cellular profiles were identified according to criteria defined by Peters et al. (1991).

To provide a better appraisal of the frequency of each type of cellular elements displaying immunolabeling, labeled cellular profiles were counted from *stratum oriens* and *stratum radiatum* in CA1, *stratum oriens* and *strata lucidum/radiatum* in CA3, and from the molecular and polymorphic layers in DG, as well as from the molecular and granule layers of the cerebellar cortex. About 60 micrographs per rat were captured in each of these layers at a magnification of 46 000. Labeled profiles of dendrites, axons,

axon terminals and dendritic spines were counted in all pictures. Results were expressed in numbers of immunopositive profiles per 100 μm^2 of neuropil. Labeled and unlabeled profiles of each category were also counted in half of the same pictures in order to determine a labeling index consisting of the percentage of each type of labeled neuronal profiles over the total number of the same type of profiles (labeled / labeled + unlabeled, spines, dendrites, axons, or axon terminals). The area of neuropil examined was calculated using *Image J* (Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.). These data were not aimed to compare the frequency of the elements between different types, since the various labeled elements differed markedly in shapes and sizes, as well as in the distribution of the labeling (cell surface, intracellular organelles, PSDs).

RESULTS

EphA7 mRNA expression in adult brain

There was only a light, diffuse autoradiographic labeling following processing for *in situ* hybridization with the EphA7 sense riboprobe on sections from adult rat or mouse brain (data not shown), demonstrating the specificity of the signal obtained with the antisense riboprobe used to map the distribution of EphA7 mRNA in adult rat (Fig. 2) and mouse (data not shown) brains. Overall, the results were highly similar in rat and mouse. In line with previous studies (Ciossek et al., 1995), we detected the strongest labeling in hippocampus, mainly in the pyramidal cell layer of CA1, CA2, and CA3 and the granular cell layer of DG (Fig. 2C,D,E). The Purkinje cell layer of the

cerebellar cortex was also strongly labeled (Fig. 2F,G), while the molecular layer displayed weak labeling and the granule cell layer showed only background labeling. Moderate intensities of the EphA7 mRNA signal were detected in the medial habenular nucleus (Fig. 2E), the striatum (Fig. 2B), globus pallidus, lateral septum, the amygdalar nucleus (Fig. 2C,E), and several sub-regions of the cerebral cortex, such as the cingulate (Fig. 2A), piriform (Fig. 2A,B) and entorhinal areas (Fig. 2E). The anterior olfactory nucleus (Fig. 2A) presented a weaker level of EphA7 mRNA. Somewhat lower expression levels were observed in neocortex (Fig. 2B,C,D,E), thalamus (Fig. 2C,D), hypothalamus and mammillary bodies, (nomenclature of Paxinos and Watson, 1986).

General distribution of the EphA7 immunoperoxydase labeling

The distribution of the EphA7 immunostaining was consistent with that of the EphA7 mRNA described above (3A,B). Moreover, the immunostaining was almost absent in sections from EphA7^{-/-} mice (Fig. 3D,G,H). The distribution of the immunostaining in wild-type mouse and rat was also comparable with the distribution reported by Ciossek et al (1999). All this evidence confirmed the specificity of the antibody for EphA7 immunohistochemistry. Since our observations on the general distribution of EphA7 were similar to those of Ciossek et al (1999), they will not be detailed here. The immunostaining distribution was highly similar in mouse and rat brains (Fig. 3A,B).

Here we focused our observations on the two brain regions displaying the strongest signals, i.e., the hippocampal formation and the cerebellar cortex.

In the dorsal hippocampal formation prepared for light microscopy with the use of Triton X100, the laminar distribution of the immunoperoxidase staining was, again, very similar in rat and wild-type mouse (Fig. 3A,B,C), although stronger in rat than mouse brain (Fig. 3A,B). However, the labeling in mouse brain sections processed for EM immunohistochemistry in the absence of Triton X-100 was often artefactual and remained present in sections from EphA7^{-/-} mice, which never occurred in sections from rat brain. Therefore, EM was performed only on sections from rat brain.

In light microscopy (with Triton X-100), the hippocampal formation displayed strong labeling, mainly in its neuropil (cell-poor) layers, in both rat and mouse, except CA1 *stratum lacunosum-moleculare*, which displayed very weak if any staining (Fig. 3C). Among hippocampal sectors, CA1 showed the strongest labeling, mainly in *strata oriens* and *radiatum*. In the DG, the molecular layer exhibited the strongest intensity, particularly nearest the granule cell layer. The cell-rich regions (pyramidal and granule cell layers) appeared weakly labeled, but their somata, as well as those of the polymorph layer of DG, were nevertheless labeled, although more weakly (Fig. 3C).

In the cerebellar cortex, the somata of Purkinje cells were the most intensely labeled elements (Fig. 3F). The molecular layer displayed much weaker intensity, while the granule cell layer appeared unlabeled (Fig. 3E,F). The pyramidal, granule and Purkinje cell somata of the hippocampus, DG and cerebellar cortex appeared to be all labeled (Fig 3C,E,F).

Ultrastructural localization of EphA7 immunostaining

In the hippocampus, as well as in the cerebellar cortex, the most frequent and obvious cell surface immunostaining was associated with dendritic spines, notably their post-synaptic densities (PSDs) (Figs. 4A,B,C, 7A,B). Cell surface labeling was also strong on some, but clearly not all astrocytic leaflets (Figs. 5A,B, 7D). Occasional cell surface labeling was also found on the plasma membrane of pyramidal, granule or Purkinje cell bodies and dendrites. This labeling sometimes interested PSDs of synapses on somata or dendrites (Figs. 4D,E,F, 6D,F), or facing unlabeled astrocytic leaflets (not shown). Labeled dendritic spines contacted most often immunonegative axon terminals. On rare occasions, two dendritic spines, one labeled and one unlabeled, formed synapses with a single unlabeled axon terminal. Generally, the labeled synapses were qualified as asymmetric since they showed an unequivocal prominent PSD. Occasional labeled somatic spines were also labeled (Fig. 6D), as well as PSDs directly on the soma (Fig. 6F) or dendritic shafts.

At variance with dendritic spines and astrocytic leaflets, the immunostaining of cell somata, dendrites, axons or axon terminals concerned mostly intracellular organelles. In the somata and proximal dendrites, the labeling was associated with the Golgi apparatus, rough endoplasmic reticulum (RER), ribosomes and various vesicles or saccules (Figs. 6A,B,C,E, 7E,F,G). In more distal dendrites, it involved mostly transport vesicles (Fig 4A,E). Several examples of labeled or unlabeled dendritic profiles displayed both labeled and unlabeled PSDs contacted by unlabeled nerve terminals. In some instances, when labeled organelles were located near the cell surface, the surface vs. intracellular labeling could not be definitely attributed to the

presence of EphA7 inside or at the surface of the cell, because of this possible local diffusion of the O^{\cdot} , oxidizing DAB (Brown, 2001). Occasional axons were also immunopositive (Fig. 5C,D); mostly unmyelinated axons intermingled with unlabeled axons in small fascicles (Fig. 5D). On rare instances we found labeled myelinated axons.

Axon terminal labeling was found on the cytoplasmic side of the vesicles (empty cores) and could interest the totality or only a subset of the synaptic vesicles; the latter usually packed close to the plasma membrane, and in such cases an occasional labeling of the surface membrane (Figs. 5E,F, 7C). The observed labeled axon terminals contacted unlabeled dendritic spines.

Mossy fiber terminals - recognized by their very large size and their densely packed vesicles - in stratum lucidum-radiatum of CA3, in the polymorph layer of DG (Fig. 4C,E), and in the granular layer of the cerebellar cortex (Fig. 6A), were unlabeled. In all cases examined, they simultaneously contacted labeled and unlabeled dendritic spines.

Quantified distribution of EphA7-labeled dendrites and dendritic spines

In order to provide a better appraisal of the frequency of the EphA7 immunostaining, labeled and unlabeled profiles of each type were counted in the neuropil layers of CA1, CA3, DG and cerebellar cortex. Somata were not counted since all pyramidal, DG granule cells and Purkinje cells appeared to be labeled in light microscopy. Astrocytic processes were also excluded from this analysis, since their

processes often did not stand out when unlabeled or were not easily identified due to the suboptimal ultrastructural preservation obtained with a PLP fixation.

The results, detailed in Fig. 8, showed rather uniform numbers of EphA7-labeled profiles of every type among neuropil layers, in every single region of hippocampal formation or in cerebellum. In CA1, we counted around 7 axon profiles per 100 μm^2 , a similar number of dendritic profiles (7 per 100 μm^2), 13 per 100 μm^2 dendritic spine profiles, and 8 per 100 μm^2 axon terminals (Fig. 8A). In CA3, the numbers of labeled profiles of axons, dendrites, dendritic spines or axon terminals were similar, around 7 per 100 μm^2 (Fig. 8B). In DG, the numbers of each type of labeled profiles amounted to 7 – 8 per 100 μm^2 , except for labeled dendritic profiles, which amounted to 13 per 100 μm^2 (Fig. 8C).

In the cerebellar cortex, the most numerous EphA7-immunopositive profiles in the molecular and granule cell layers were of dendritic spines (9 per 100 μm^2), whereas labeled axon or axon terminal profiles were less frequent by half (4-5 per 100 μm^2) and labeled dendritic profiles were rare (1 per 100 μm^2) (Fig. 8D).

To gain a better insight of the significance of these numbers for dendritic spines, which represented the major sites of cell surface labeling, we calculated a labeling index (labeled profiles / labeled + unlabeled spine profiles) giving the proportion of these profiles that were labeled (Fig. 8E).

In the hippocampal formation, CA1, CA3, or DG 38 - 42% of the dendritic spine profiles were labeled, in the neuropil layers. In the cerebellar cortex, 58% of the

dendritic spine profiles were labeled, in both the molecular and granular layers (8E). All labeled spine profiles had a labeled PSD.

Comparable labeling indexes were calculated for dendritic shaft profiles. Thus, in hippocampal CA1 and CA3, around 21-22% of dendritic shaft profiles contained labeling, while nearly 50% displayed the immuno-label in DG (8F). In the cerebellar cortex only 10% of the dendritic profiles were labeled (8F).

In dendritic shafts, however, the labeling was largely intracellular. They nevertheless displayed an occasional labeled PSD. We thus calculated the proportion of the labeled dendritic profiles that contained a labeled PSD directly on the shaft. In the hippocampal formation, 9% labeled dendritic profiles displayed a labeled PSD in the DG, compared to only about 1 - 3% in CA1 and CA3 (Fig. 8G). Thus, the probability of finding a PSD directly on dendritic shaft profiles was relatively low in the hippocampal formation. At variance, although few dendritic shaft profiles were labeled in the cerebellar cortex, nearly half of them displayed a labeled PSD (8G), indicating that PSDs were more frequent in these dendrites.

DISCUSSION

Like other Eph receptors and ephrins, EphA7 has been associated with various processes involving the regulation of cell adhesion or motility through intercellular communication. In adult brain, several EphA and EphB receptors have been associated with synaptic plasticity, notably in hippocampus (Hruska and Dalva, 2012; Klein, 2009). Along this line, the main finding of this study is that the surface localization of

this protein concerns mainly asymmetric synapses, particularly in the PSDs of dendritic spines, in the hippocampal formation and cerebellum. Labeling of PSDs in dendrites or cell bodies was also observed occasionally. Surface labeling of astrocytic leaflets was also relatively frequent. Otherwise, when cell membranes were labeled at the dendritic or somatic level, it appeared to be associated with unlabeled astrocytic processes. Thus, most of the somatic, dendritic, axonal, or axon terminal labeling was located intracellularly, associated with vesicles, saccules or Golgi apparatus, i.e. the synthetic or trafficking machineries.

Labeling specificity

Three sets of evidence demonstrate the specificity of the *in situ* hybridization for EphA7 mRNA and the EphA7 immunohistochemical labeling.

Firstly, in the present study, the *in situ* hybridization of the EphA7 antisense probe, devised to recognize an mRNA sequence specific for the EphA7 extracellular domain, provided a signal distribution entirely consistent with the distribution of the immunolabeling of the EphA7 protein, taking into account the eventual transport of the protein in neuronal or glial processes. *In situ* hybridization of the complementary sense probe gave only a faint diffuse labeling in autoradiography.

Secondly, there was a near complete reduction of the immunohistochemical signal in EphA7^{-/-} mouse brain sections.

Thirdly, the distribution of the EphA7 immunolabeling was also consistent with a report from Ciossek et al (1999). The latter report was based on the use of 2 different antibodies recognizing respectively the intracellular domain of the full length EphA7

(EphA7-FL) or an intracellular domain specific to a truncated isoform (EphA7-TK-), and replacing the EphA7-FL intracellular domain. Our own antibody, recognizing the intracellular domain of EphA7-FL, was therefore specific for EphA7-FL and was expected to display a labeling distribution similar to the first antibody used by Ciossek et al (1999). One notable difference concerned the detection of EphA7-FL in the somata of pyramidal and Purkinje cells in the present report, whereas Ciossek et al (1999) reported no somatic immunolabeling in adult hippocampus and cerebellar cortex with their anti-EphA7-FL antibody. We attribute the immunolabeling in cell bodies, in the present study, to a more sensitive detection of the protein in our conditions. As stated above, we could not detect the truncated EphA7-TK- isoform reported by Ciossek et al (1999). These authors proposed that this isoform might serve to inhibit signalization by the full length EphA7-FL that might be present in the somata. The present observations show that the full-length isoform is indeed present in this location, with a small proportion expressed at the cell body surface. One might also speculate that the role of the EphA7-TK- isoform might be to serve as a simple ligand, without signaling ability, but able to activate an ephrin-A in the nerve terminals making synaptic contacts near the somatic region.

Lastly, we also examined the distribution of the EphA7 immunolabeling in the striatum of neonatal rats and mice (not illustrated) and found its localization in matrisomes, as described by Tai et al. (2013), constituting further evidence that our antibody detected the same protein as those previous reports.

Cell surface vs intracellular localizations

EphA7 being a tyrosine kinase receptor involved in direct cell-cell interactions, it is expected to exert its functions at the surface of the cells. The antibody used in the present study, since recognizing the cytoplasmic domain of the receptor, is expected to produce near cell surface DAB labeling, on or just beneath the cell membrane. In the hippocampal formation, its cell surface localization concerned foremost the PSDs of dendritic spines. It was also occasionally detected in the PSDs of dendritic synapses and, rarely, in the PSDs of somatic spines or direct somatic synapses. It thus appears that these synaptic sites are the essential sites of action of neuronally expressed EphA7. A similar location has been reported for EphA4 (Tremblay et al., 2007; Tremblay et al., 2009). We previously demonstrated, using cell fractionation and Western blotting, that EphA4 was more strongly bound than EphB2 in the core of PSDs in hippocampus (Bouvier et al., 2008; Bouvier et al., 2010).

In the molecular and granular layers of the cerebellar cortex, the cell surface localization of EphA7 was also essentially detected in the PSDs of dendritic spines. Labeled PSDs were also relatively more frequent in labeled dendritic shafts, in this brain region.

Another significant cell surface detection of EphA7 concerned astrocytic leaflets, in both hippocampus and cerebellum. Similar labeling of astrocytes has also been reported for EphA4 in the hippocampus (Tremblay et al., 2007; Tremblay et al., 2009). Since the labeled leaflets represented only a minority of such astrocytic processes, one may postulate that they represent active motile leaflets. The motility of

astrocytic leaflets has been shown to influence synaptic function (Pاناتier and Olié, 2006). The role of Eph receptors in astrocytes remains mostly unknown. One report (Nestor et al., 2007) associated the activation of astrocyte EphA4 with the motility of their small filopodia, in neonatal hippocampal slices. A precise understanding of the morphological relationships of EphA4- or EphA7-labeled astrocytic leaflets with synapses, following 3D reconstruction of serial ultrathin sections, might provide some insights on such roles.

In the hippocampal formation, cell bodies, dendrites, axons and axon terminals, or varicosities, the immunolabeling was essentially intracellular, associated with vesicles and other elements of the synthetic and trafficking machineries. Similarly, in cerebellar cortex, although the strongest labeling of EphA7 concerned Purkinje cell bodies, when examined in light microscopy, electron microscopy showed that such labeling was again essentially intracellular, again associated with the synthetic and trafficking organelles.

The EphA4 immunolabeling of vesicles was supported by cell fractionation / Western blotting experiments demonstrating that this receptor was indeed associated with both clathrin-coated and synaptic vesicles, suggesting roles in synaptic function (vesicle release, endocytosis, trafficking). Indeed, stimulation of hippocampal neurons in culture with KCL was followed by a subsequent increase of EphA4 at the cell surface (Bouvier et al., 2010).

Interestingly, we found several instances of axons viewed in longitudinal section, where the inter-varicose axon was strongly labeled (on vesicles), between two

unlabeled axonal varicosities (or terminals). This observation raises several issues. Firstly, since in many cases, labeled varicosities contained only a subpopulation of labeled vesicles, the unlabeled varicosity profiles might represent sections from labeled varicosities that excluded the labeled vesicles. Alternatively, one may speculate that some of the varicosities from neurons expressing EphA7 do not contain the protein, which might be addressed selectively towards specific synapses. Lastly, one may speculate that the turnover/recycling/retrograde transport of EphA7 occur very rapidly in some situations, leaving the terminal depleted of its stock of the receptor. It should be noted that the labeled inter-varicose axons would appear like varicosities in confocal microscopy.

Similar considerations might apply to dendritic profiles (labeled or not) displaying both labeled and unlabeled spine profiles. This suggests that a neuron expressing EphA7 does not necessarily transport the protein to all its dendritic spines, even at the level of a single dendritic shaft.

In the hippocampus, the distribution of EphA7 among cellular compartments at the ultrastructural level was very similar to that of EphA4 (Tremblay et al., 2007). In light microscopy, it appears that most, if not all, pyramidal neurons express both EphA4 and EphA7, indicating that they are likely co-localized in these cells. They are also most likely co-localized also in the same dendritic spines, unless they are addressed to different spines (which might explain why both labeled and unlabeled spines were present on the same dendritic shaft). Dual labeling will be needed to resolve this issue. In the eventuality of a co-localization, it would be important to examine the impact on ligand binding and bi-directional signalization.

CONCLUSIONS

We conclude that the largest amount of EphA7 detected by immunohistochemistry is present inside the cells, associated with the synthetic and trafficking machineries. However, the surface localization in neurons, where this tyrosine kinase is likely to exert its functions, concerned essentially the PSDs of axo-spinal synapses, axo-dendritic or axo-somatic asymmetrical synapses. Moreover, EphA7 immunolabeling was also associated with the surface of some astrocytic leaflets, also likely associated with synaptic function or plasticity.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the National Science and Engineering Research Council of Canada (Grants to G.Do. and G.Dr.), an infrastructure grant from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS grant to GRSNC).

A.C.A. held studentships from the Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) and the Faculté de médecine of the Université de Montréal. W.J was supported by studentships from GRSNC and FRQS.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interests to report.

LITERATURE CITED

- Ashton RS, Conway A, Pangarkar C, Bergen J, Lim KI, Shah P, Bissell M, Schaffer DV. 2012. Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling. *Nature neuroscience* 15(10):1399-1406.
- Bouvier D, Corera AT, Tremblay ME, Riad M, Chagnon M, Murai KK, Pasquale EB, Fon EA, Doucet G. 2008. Pre-synaptic and post-synaptic localization of EphA4 and EphB2 in adult mouse forebrain. *Journal of neurochemistry* 106(2):682-695.
- Bouvier D, Tremblay ME, Riad M, Corera AT, Gingras D, Horn KE, Fotouhi M, Girard M, Murai KK, Kennedy TE, McPherson PS, Pasquale EB, Fon EA, Doucet G. 2010. EphA4 is localized in clathrin-coated and synaptic vesicles in adult mouse brain. *Journal of neurochemistry* 113(1):153-165.
- Brown WJ. 2001. Immunoperoxidase methods for localization of antigens in cultured cells and tissues. *Current protocols in cell biology* / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] Chapter 4:Unit 4 6.
- Cesa R, Premoselli F, Renna A, Ethell IM, Pasquale EB, Strata P. 2011. Eph receptors are involved in the activity-dependent synaptic wiring in the mouse cerebellar cortex. *PloS one* 6(4):e19160.
- Ciossek T, Millauer B, Ullrich A. 1995. Identification of alternatively spliced mRNAs encoding variants of MDK1, a novel receptor tyrosine kinase expressed in the murine nervous system. *Oncogene* 10(1):97-108.
- Ciossek T, Ullrich A, West E, Rogers JH. 1999. Segregation of the receptor EphA7 from its tyrosine kinase-negative isoform on neurons in adult mouse brain. *Brain research Molecular brain research* 74(1-2):231-236.

- Contractor A, Rogers C, Maron C, Henkemeyer M, Swanson GT, Heinemann SF. 2002. Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science* 296(5574):1864-1869.
- Depaepe V, Suarez-Gonzalez N, Dufour A, Passante L, Gorski JA, Jones KR, Ledent C, Vanderhaeghen P. 2005. Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* 435(7046):1244-1250.
- Egea J, Klein R. 2007. Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends in cell biology* 17(5):230-238.
- Figueroa JD, Benton RL, Velazquez I, Torrado AI, Ortiz CM, Hernandez CM, Diaz JJ, Magnuson DS, Whittemore SR, Miranda JD. 2006. Inhibition of EphA7 up-regulation after spinal cord injury reduces apoptosis and promotes locomotor recovery. *Journal of neuroscience research* 84(7):1438-1451.
- Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, Flenniken A, Pan L, Ryan TE, Henkemeyer M, Strebhardt K, Hirai H, Wilkinson DG, Pawson T, Davis S, Yancopoulos GD. 1996. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17(1):9-19.
- Goldshmit Y, McLenachan S, Turnley A. 2006. Roles of Eph receptors and ephrins in the normal and damaged adult CNS. *Brain research reviews* 52(2):327-345.
- Himanen JP, Chumley MJ, Lackmann M, Li C, Barton WA, Jeffrey PD, Vearing C, Geleick D, Feldheim DA, Boyd AW, Henkemeyer M, Nikolov DB. 2004. Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nature neuroscience* 7(5):501-509.
- Himanen JP, Nikolov DB. 2003. Eph receptors and ephrins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35(2):130-134.

- Holmberg J, Clarke DL, Frisen J. 2000. Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 408(6809):203-206.
- Hruska M, Dalva MB. 2012. Ephrin regulation of synapse formation, function and plasticity. *Molecular and cellular neurosciences* 50(1):35-44.
- Jing X, Miwa H, Sawada T, Nakanishi I, Kondo T, Miyajima M, Sakaguchi K. 2012. Ephrin-A1-mediated dopaminergic neurogenesis and angiogenesis in a rat model of Parkinson's disease. *PloS one* 7(2):e32019.
- Klein R. 2004. Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Current opinion in cell biology* 16(5):580-589.
- Klein R. 2009. Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling. *Nature neuroscience* 12(1):15-20.
- Kullander K, Klein R. 2002. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 3(7):475-486.
- Lee H, Park E, Kim Y, Park S. 2013a. EphrinA5-EphA7 complex induces apoptotic cell death via TNFR1. *Molecules and cells* 35(5):450-455.
- Lee J, Corcoran A, Han M, Gardiner DM, Muneoka K. 2013b. Dlx5 and Msx2 regulate mouse anterior neural tube closure through ephrinA5-EphA7. *Development, growth & differentiation* 55(3):341-349.
- Lim YS, McLaughlin T, Sung TC, Santiago A, Lee KF, O'Leary DD. 2008. p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* 59(5):746-758.
- Lisabeth EM, Falivelli G, Pasquale EB. 2013. Eph receptor signaling and ephrins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(9).

- Mansi JA, Laforest S, Drolet G. 2000. Effect of stress exposure on the activation pattern of enkephalin-containing perikarya in the rat ventral medulla. *Journal of neurochemistry* 74(6):2568-2575.
- Marler KJ, Becker-Barroso E, Martinez A, Llovera M, Wentzel C, Poopalasundaram S, Hindges R, Soriano E, Comella J, Drescher U. 2008. A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(48):12700-12712.
- Marler KJ, Poopalasundaram S, Broom ER, Wentzel C, Drescher U. 2010. Pro-neurotrophins secreted from retinal ganglion cell axons are necessary for ephrinA-p75NTR-mediated axon guidance. *Neural development* 5:30.
- Martinez A, Otal R, Sieber BA, Ibanez C, Soriano E. 2005. Disruption of ephrin-A/EphA binding alters synaptogenesis and neural connectivity in the hippocampus. *Neuroscience* 135(2):451-461.
- McLean IW, Nakane PK. 1974. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 22(12):1077-1083.
- Mouginot D, Laforest S, Drolet G. 2007. Challenged sodium balance and expression of angiotensin type 1A receptor mRNA in the hypothalamus of Wistar and Dahl rat strains. *Regulatory peptides* 142(1-2):44-51.
- Nestor MW, Mok LP, Tulapurkar ME, Thompson SM. 2007. Plasticity of neuron-glia interactions mediated by astrocytic EphARs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(47):12817-12828.
- Palmer A, Klein R. 2003. Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes & development* 17(12):1429-1450.

- Panatier A, Oliet SH. 2006. Neuron-glia interactions in the hypothalamus. *Neuron glia biology* 2(1):51-58.
- Pasquale EB. 2004. Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear. *Nature neuroscience* 7(5):417-418.
- Paxinos G, Watson C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney ; Orlando: Academic Press. xxvi, 237 p. of plates p.
- Peters A, Palay SL, Webster Hd. 1991. The fine structure of the nervous system : neurons and their supporting cells. New York: Oxford University Press. xviii, 494 p. p.
- Rogers JH, Ciossek T, Ullrich A, West E, Hoare M, Muir EM. 1999. Distribution of the receptor EphA7 and its ligands in development of the mouse nervous system. *Brain research Molecular brain research* 74(1-2):225-230.
- Tai AX, Cassidy RM, Kromer LF. 2013. EphA7 expression identifies a unique neuronal compartment in the rat striatum. *The Journal of comparative neurology* 521(12):2663-2679.
- Tremblay ME, Riad M, Bouvier D, Murai KK, Pasquale EB, Descarries L, Doucet G. 2007. Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus. *The Journal of comparative neurology* 501(5):691-702.
- Tremblay ME, Riad M, Chierzi S, Murai KK, Pasquale EB, Doucet G. 2009. Developmental course of EphA4 cellular and subcellular localization in the postnatal rat hippocampus. *The Journal of comparative neurology* 512(6):798-813.
- Yamaguchi Y, Pasquale EB. 2004. Eph receptors in the adult brain. *Current opinion in neurobiology* 14(3):288-296.
- Zhuang Z, Huang J, Cepero ML, Liebl DJ. 2011. Eph signaling regulates gliotransmitter release. *Communicative & integrative biology* 4(2):223-226.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. A) Schematic representation of EphA7 and its isoforms. The extracellular domain contains, in blue, the ephrin-binding domain (Eph), in yellow, a cysteine phosphorylation site, in purple, two fibronectin Type III domains. The intracellular domain is composed of the tyrosine kinase domain, in pink; the Sterile Alpha Motif or SAM domain, in green, and the PDZ-binding sequence in orange. **B)** The corresponding amino acid sequences of the different protein domains (same color code as in A). Underlined at the bottom is the peptide sequence that was used for the production of the EphA7 antibody used in this study. White spots represent the missing sequences, in isoforms MDK1.1 (SGKMFE) and 1.2 (KFPG). In the truncated isoform EphA7-T1, the intracellular sequence FKFPGTKTYID of the full-length isoform is replaced by the sequence SLVTNEHLSLV, as represented in red in A. Similarly, the sequence intracellular FKFPGTKTYIDPETYEDPNRAVHQFAK of the full-length isoform is replaced by the sequence SLYRERGDGMEKTQHHNKKWMIASCSRL, and represented in red in A, in the truncated EphA7-2 isoform. The data used to prepare this figure come from the following two web sites: 1) National Center for Biotechnology Information: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_010141.3; 2) The European Bioinformatics Institute: <http://www.ebi.ac.uk/s4/summary/molecular/protein?term=mdk1&classification=10090&tid=synENSMUSG000000028289>.

Figure 2. A-F) Film autoradiographs of EphA7 mRNA following *in situ* hybridization. Note the highest signal detected in hippocampus formation (HPF), in the cell layers of CA1, CA3 and DG (**C,D,E**). EphA7 is transcribed more moderately in the thalamus

(TH) (**C,D**), medial habenular nucleus (MHb) (**E**), caudate putamen (CPu) (**B,C**), amygdalar nucleus (AN) (**C,E**) and piriform / entorhinal cortex (Ctx) (**B,C,D,E**). In the cerebellar cortex (CBX), the Purkinje cells layer is strongly labeled (**F**). **G**: Cerebellar cortex in dark field illumination of liquid emulsion autoradiography, showing the strong labeling of Purkinje cells. Pir, piriform cortex, ENT, enthorinal cortex, Uvu, uvula, MHb, medial habenular nucleus, LS, lateral septal nucleus, RS, retrosplenial cortex. Scale bars= 1mm, **G**= 200 μ m.

Figure 3. **A)** EphA7-immunolabeled sections from adult rat and **B)** wild-type mouse, showing similar distribution patterns of EphA7. **C)** Dorsal hippocampus from wild-type and **D)** EphA7^{-/-} mouse, showing the specificity of the EphA7 immunostaining. Abbreviations: *stratum oriens* (o), pyramidal cell layer (p), *stratum radiatum* (r) and *stratum lacunosum-moleculare* of CA1, *stratum oriens* (o), pyramidal cell layer (p) and *strata lucidum/radiatum* (l/r) of CA3 and molecular (m), granule cell (g) and polymorph layers of DG. (**E**) Cerebellum from a wild-type mouse, (**F**) High-magnification of the cerebellar cortex, showing the strong staining of the Purkinje cells layer (p). Other abbreviations: molecular (m) and granule cells layers (g). **G** and **H**) Cerebellar cortex of EphA7^{-/-} mouse. Scale bars = 1 mm in A, C, D, E; 250 μ m in B, G, F; 100 μ m in H.

Figure 4. **A,B,C)** EphA7-immunoreactive dendritic spines (s+) and **D,E,F)** dendritic branches (d+). **A)** From CA1 *stratum radiatum*: at top left, a labeled dendritic spine (s+) forming an asymmetrical synapse with an unlabeled axon varicosity (t-). At the bottom: a small, labeled dendritic shaft (d+) containing labeled vesicles, and bearing a labeled dendritic spine (s+). Note labeling of the PSDs in dendritic spines. **B)**

Unlabeled dendritic branch (d-), in CA3 *stratum radiatum*, displaying one labeled dendritic spine (s+, arrowhead at the top) and one unlabeled dendritic spine (s-, at the bottom). Note also a labeled axon (a+) on the right. **C)** Unlabeled mossy fiber axon terminal (t-) synapsing with a labeled dendritic spine (s+) in CA3 *stratum lucidum/radiatum*. **D)** Three immunopositive PSDs (arrowheads) in a dendritic branch (d+) contacted by 3 unlabeled nerve terminals (t-) in the molecular layer of DG. **E)** Dendritic shaft (d+) showing a few labeled vesicles and forming synapses (arrowheads) with an unlabeled mossy fiber axon terminal (t-) in CA3 *stratum lucidum/radiatum*. **F)** Asymmetric synapse between an unlabeled axon terminal (t-) and a labeled dendrite (d+, arrowhead) in CA1 *stratum radiatum*. As-, unlabeled astrocytic process, a+, labeled axon, a-, unlabeled axon. Scale bars = 100 nm.

Figure 5. **A)** Labeled astrocytic leaflet (*). Note continuity with the unlabeled part of the same astrocyte process (As) in CA3 *strata lucidum/radiatum*. **B)** EphA7-immunolabeled astrocytic leaflet surrounding an unlabeled terminal (t-) and touching a labeled nerve terminal (t+) itself synapsing on an unlabeled dendritic spine, in CA3 *stratum oriens*. **C)** Labeled axon segment (a+) between two unlabeled axon terminals (t-), in CA3 *stratum oriens*. **D)** Labeled axons (a+) in a bundle of unlabeled axons (a-), in CA3 *strata lucidum/radiatum*. **E)** Labeled axon terminal with a synaptic contact onto an unlabeled dendritic spine (s-), in CA3 *strata lucidum/radiatum*. **F)** Rare example of a synaptic contact between a labeled axon terminal and a labeled dendritic spine (s+). Note the other contact by the same terminal with an unlabeled dendritic spine (s-), in DG polymorph layer. Scale bars= 100 nm.

Figure 6. EphA7 immunolabeling in neural cell bodies from the hippocampal formation. **A)** Intracellular labeling associated with the rough endoplasmic reticulum (RER) and ribosomes / polysomes in a DG granule cell. **B)** Labeled vesicles in a CA3 pyramidal cell. **C)** Labeled saccules of the Golgi apparatus (g) in a granule cell soma. **D)** Labeled somatic spine on a CA3 pyramidal cell (S+). **E)** Rough endoplasmic reticulum (RER) labeling. **F)** Axo-somatic synapse with a labeled PSD on a CA3 pyramidal cell. N, nucleus. Scale bars = 500 nm in A and E and 100 nm in B, C, D, F.

Figure 7: EphA7-immunolabeling in rat cerebellar cortex. **A, B)** dendritic spines (s+) with immunolabeled PSDs (arrowheads). Note the labeling of the spine apparatus in B. **(C)** Axon terminals. **D)** Astrocytic process (As+) **E)** Purkinje cell soma. **F)** Labeled Golgi apparatus (g) from boxed area in E. **G)** Labeling of rough endoplasmic reticulum (RER). N, nucleus. Scale bars = 100 nm in A, B, C, D, F, G and 500 nm in E.

Figure 8. Numbers per $10^2 \mu\text{m}^2$ of neuropil surface (\pm SEM) of labeled axons, dendrites, dendritic spines and axon terminals counted in **A)** CA1 *stratum oriens* (o) and *stratum radiatum* (r); **B)** in CA3 *stratum oriens* (o) and *strata lucidum/radiatum* (l/r); **C)** in DG molecular (m) and polymorph (po) layers; and **D)** in the cerebellar cortex molecular (m) and granular (g) layers. **E)** Labeling indexes or percentages of labeled dendritic spines over the total of all dendritic spines (labeled or not) in each region. **F)** Labeling indexes for dendrites (\pm SEM). **(G)** Percentage of labeled dendrites displaying a labeled PSD (\pm SEM).

FIGURES

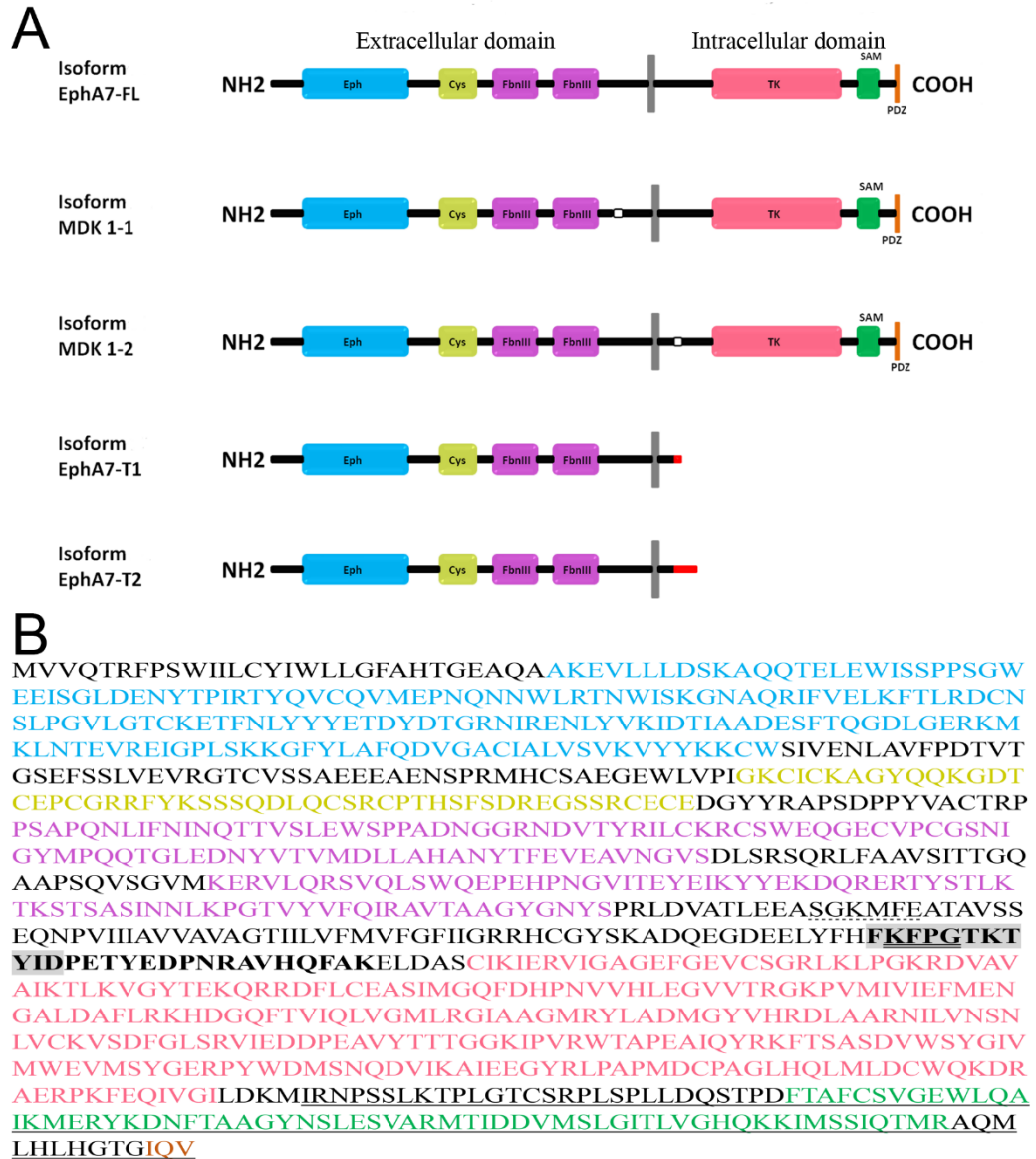


Figure 1

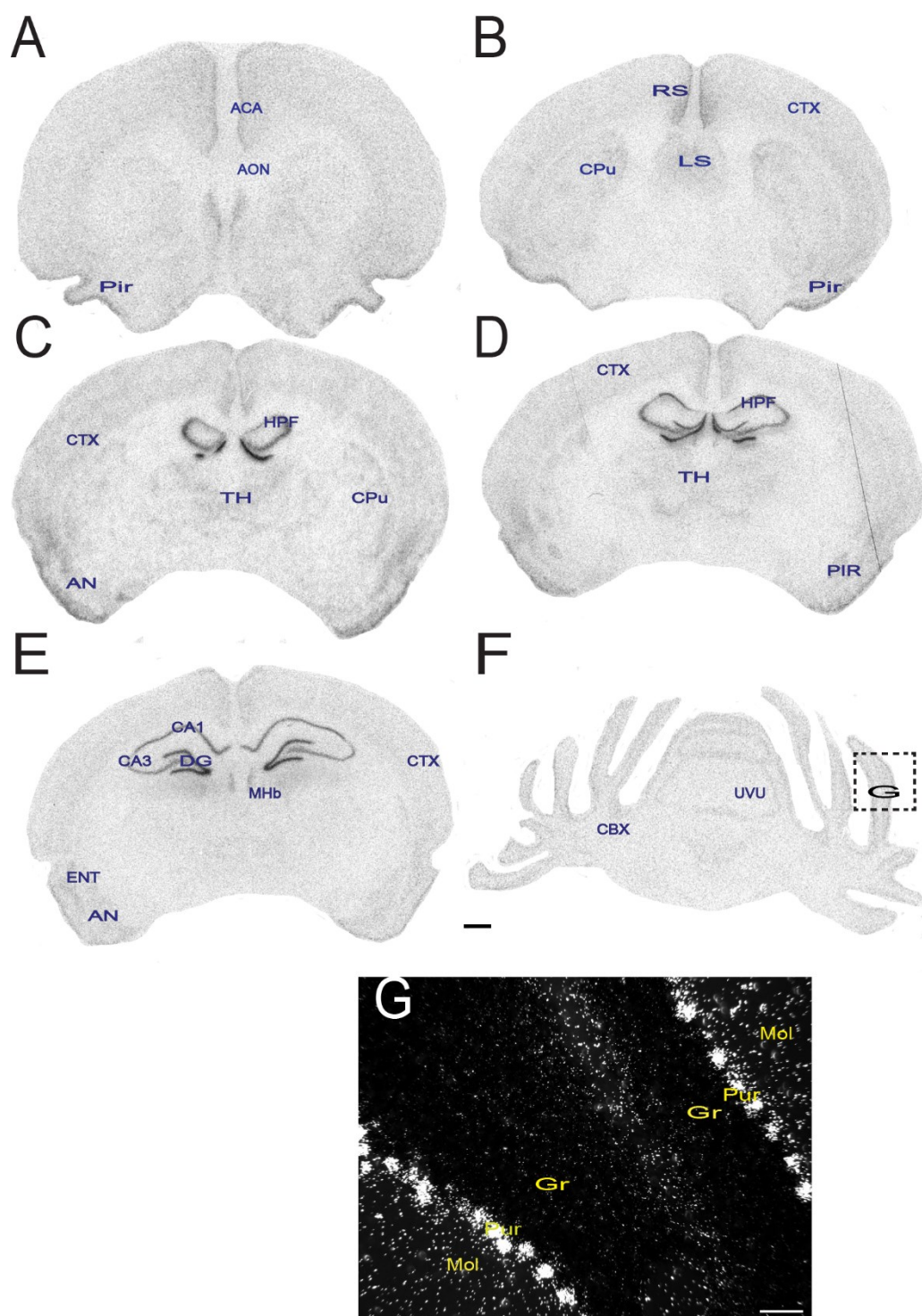


Figure 2

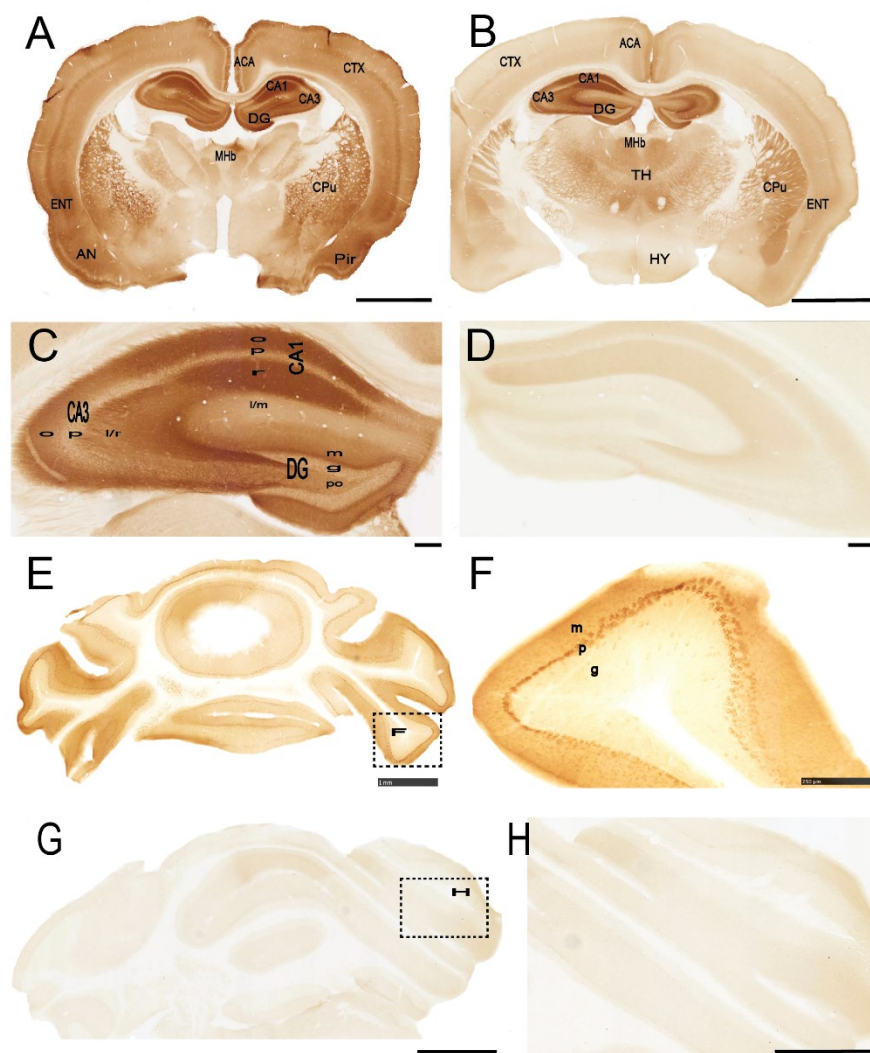


Figure 3

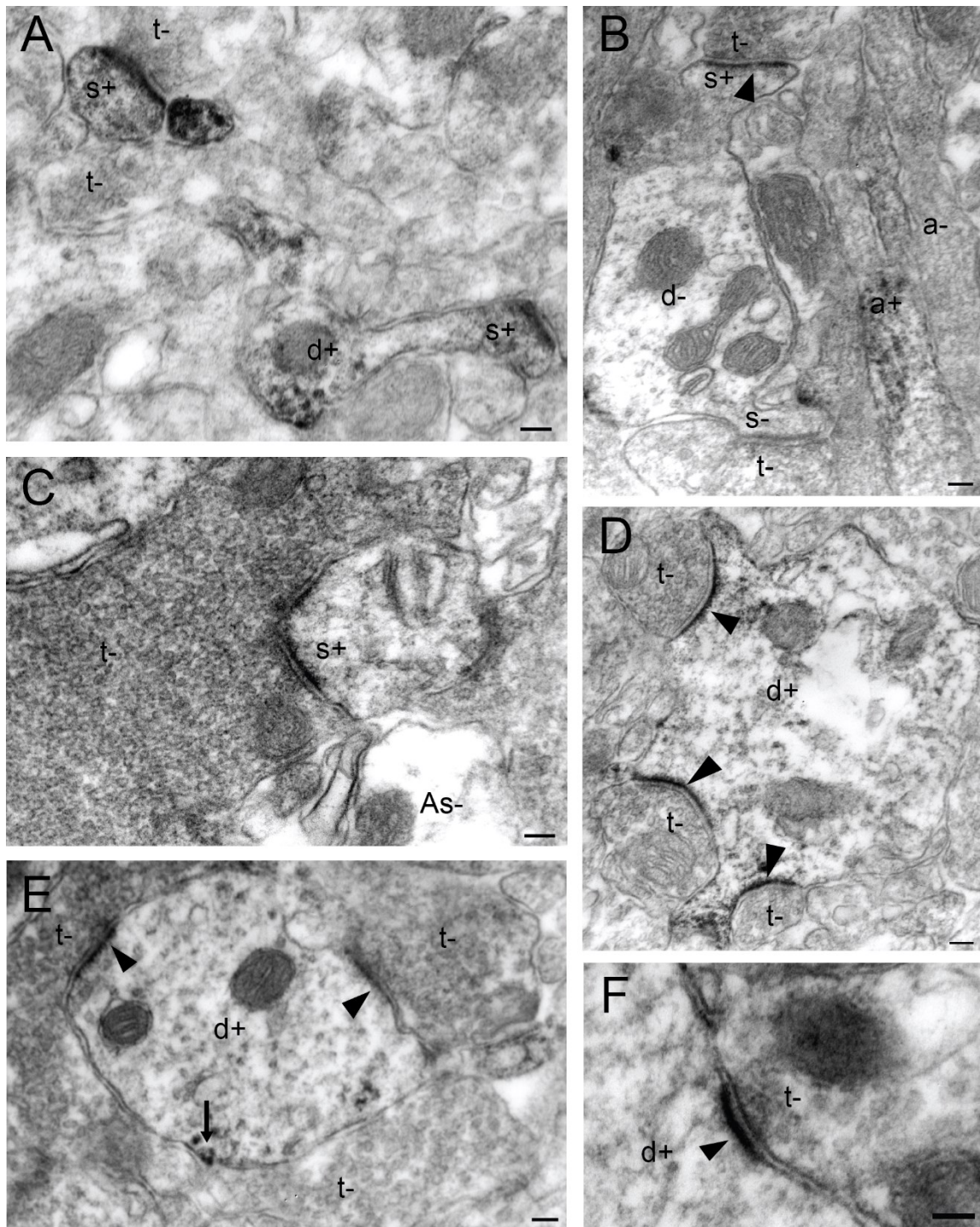


Figure 4

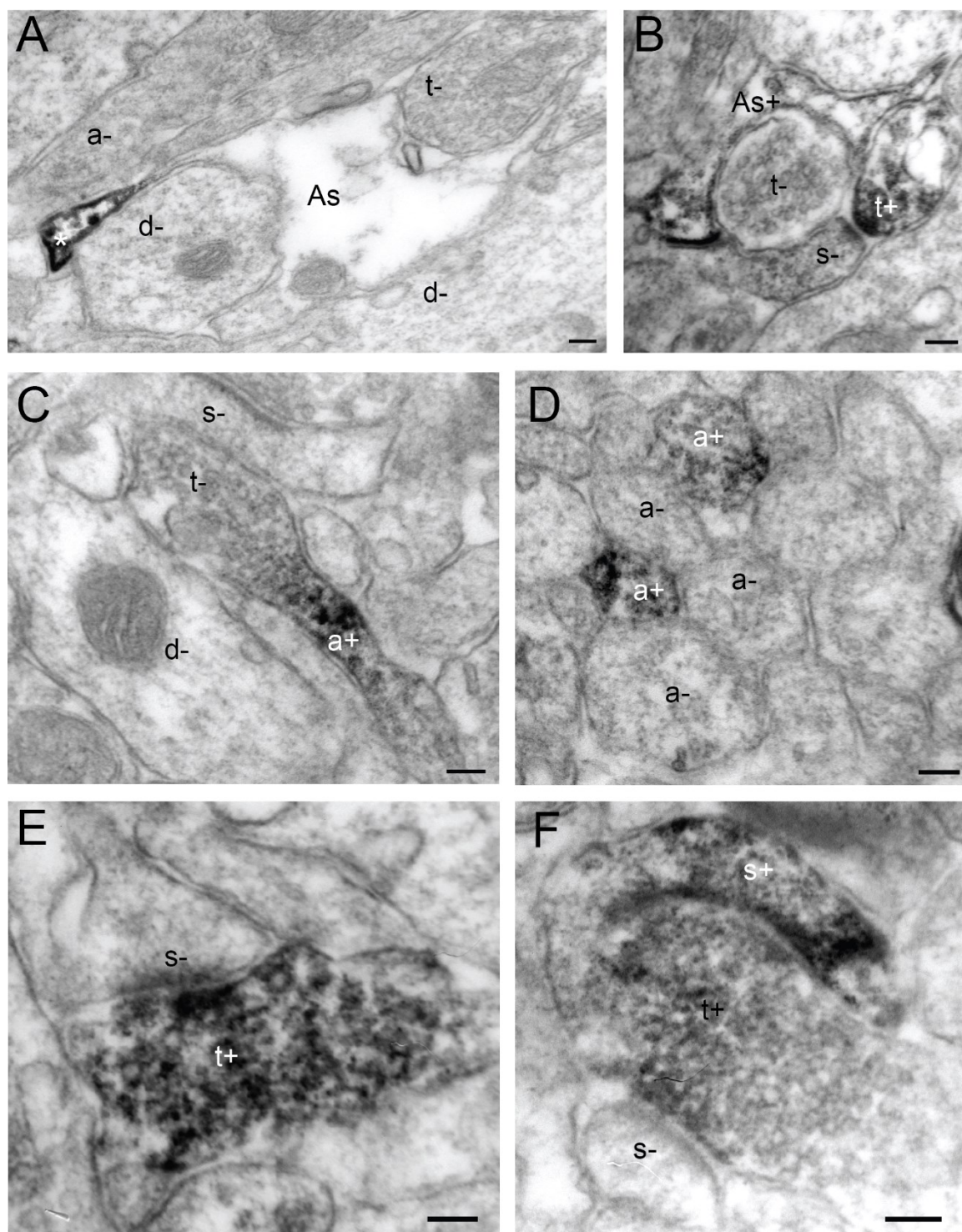


Figure 5

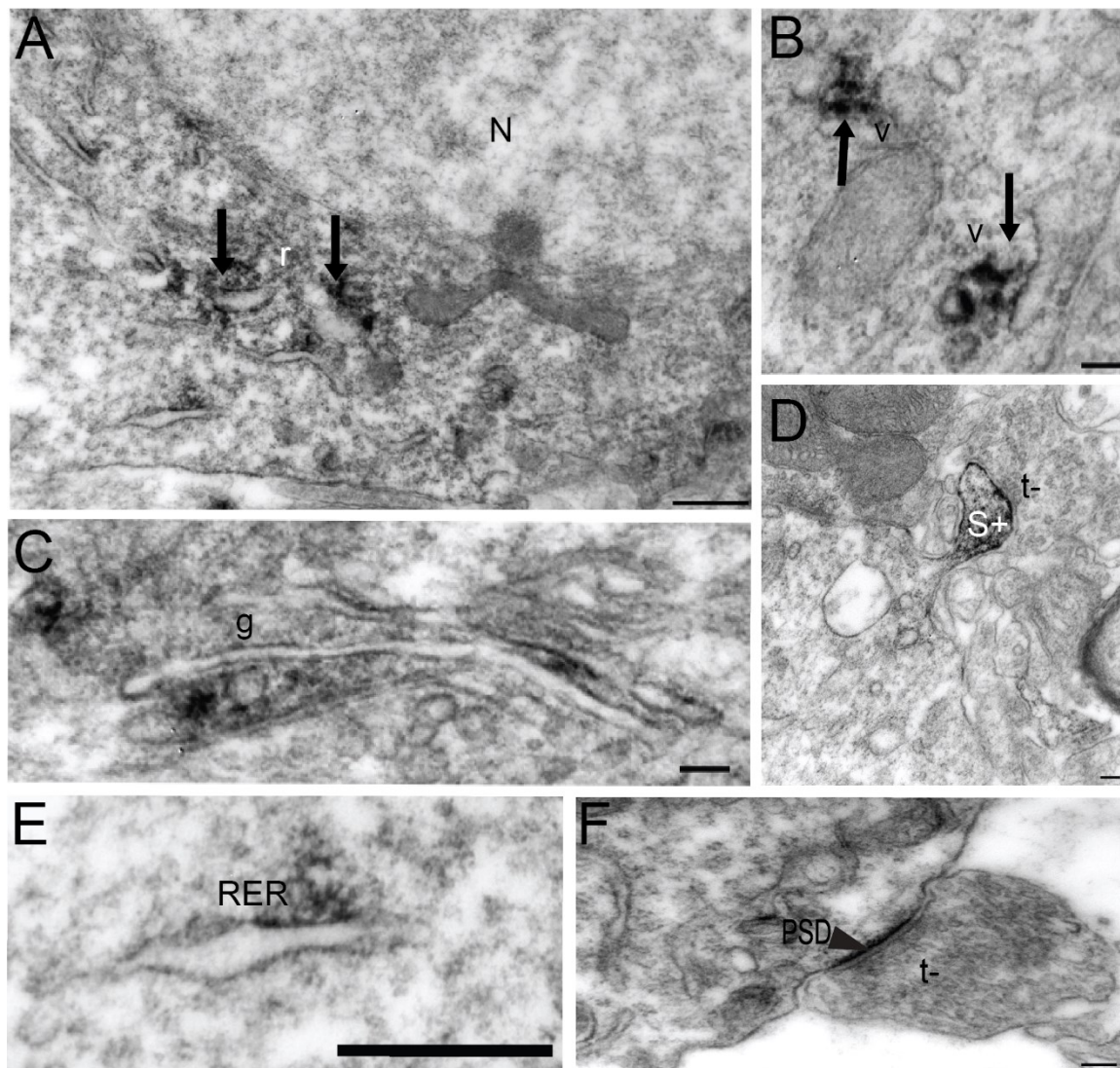


Figure 6

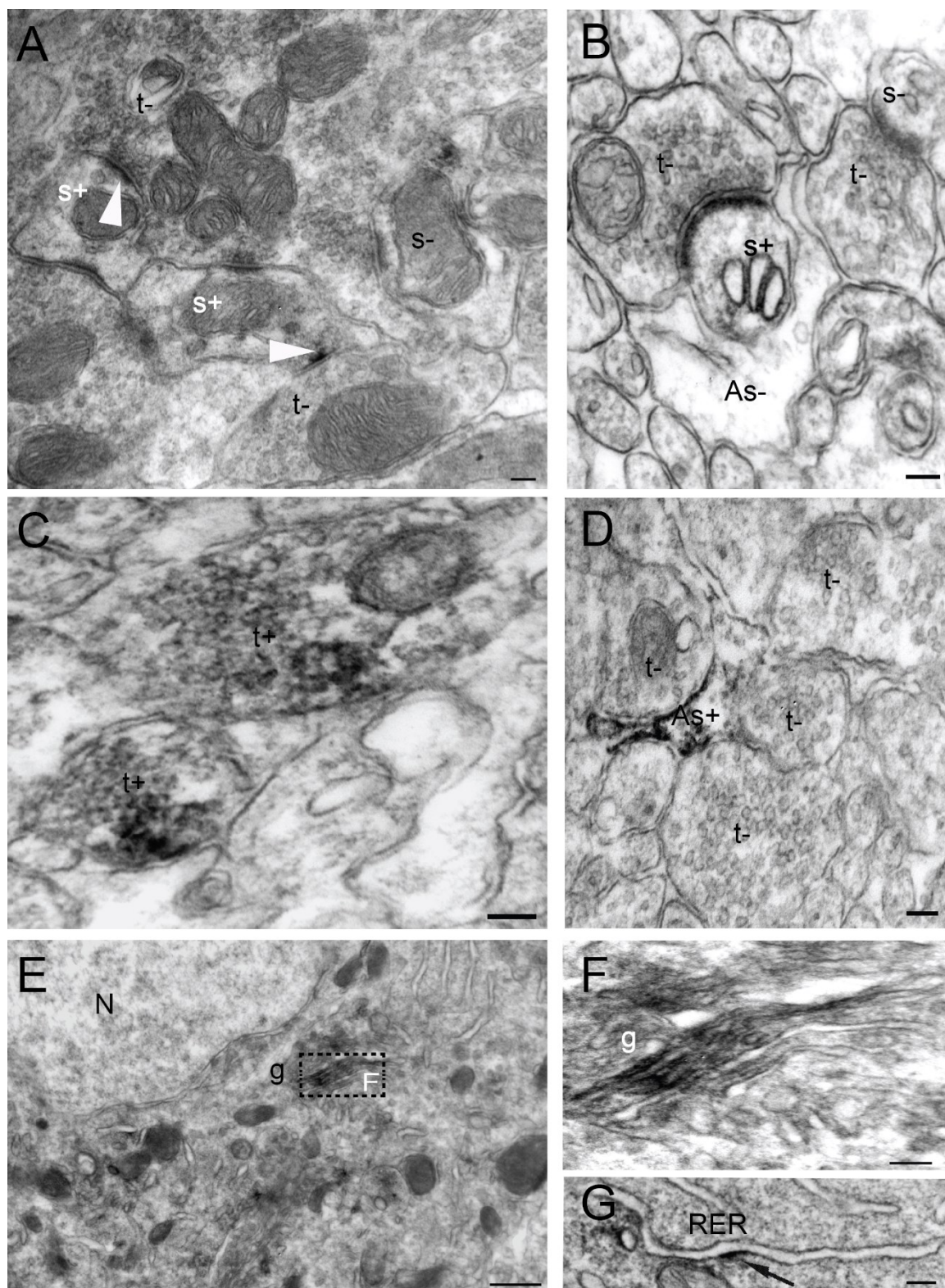


Figure 7

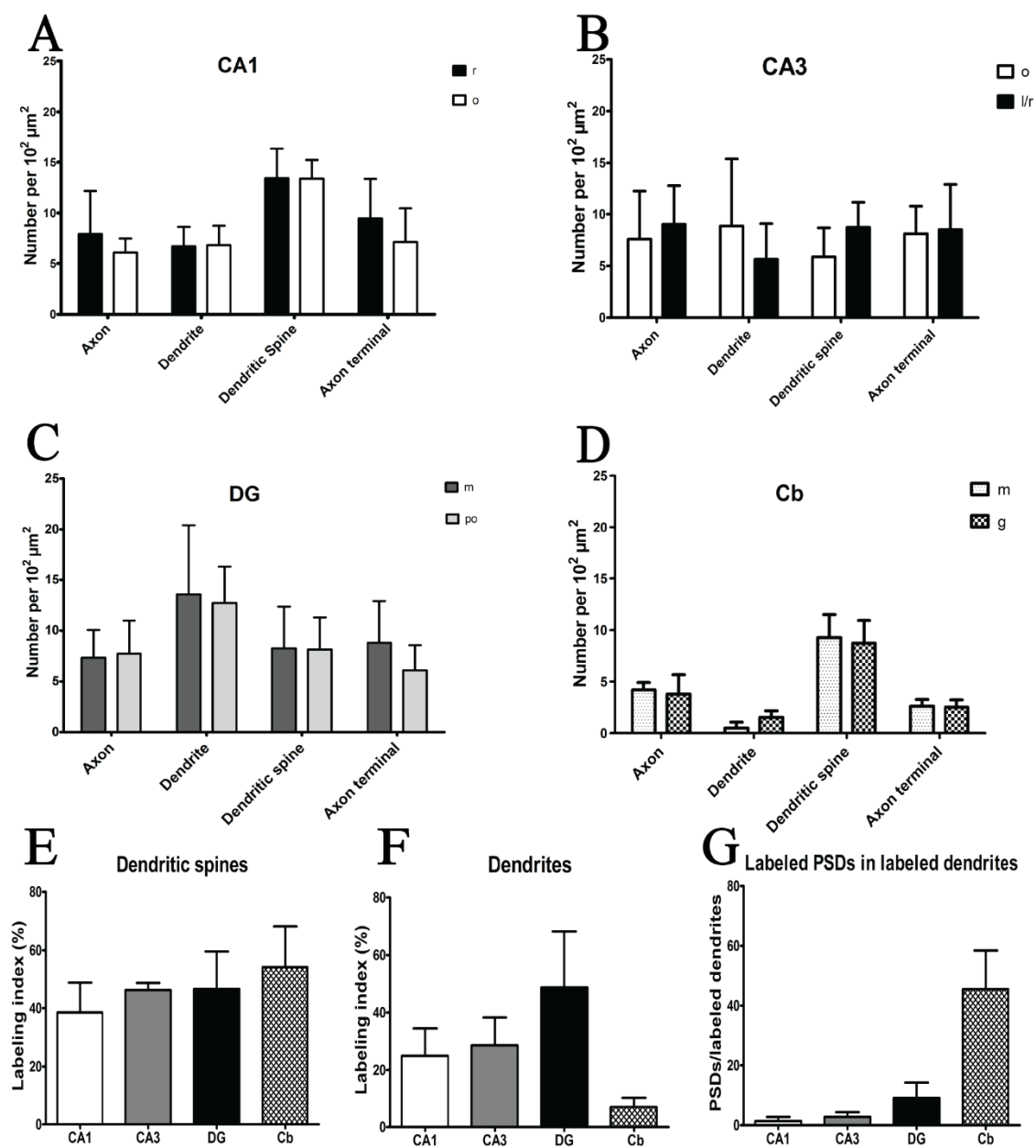


Figure 8

Chapitre 3

1. Discussion

Dans la présente étude, nous avons examiné la distribution régionale, sous-régionale et ultrastructurale du récepteur EphA7 dans le cerveau de rats adultes. Au niveau ultrastructural, notre analyse a porté sur la formation de l'hippocampe (CA1, CA3 et DG) et le cortex cérébelleux qui représentent des régions reconnues pour leur forte plasticité (Yamaguchi and Pasquale, 2004). À notre connaissance, cela représente la toute première analyse détaillée de la distribution ultrastructurale d'EphA7 dans le cerveau mature. Nos résultats fournissent une preuve morphologique d'un rôle clé d'EphA7 dans le fonctionnement ou la plasticité synaptique du SNC adulte.

1.1. Localisation régionale d'EphA7

De manière générale, nos données d'hybridation *in situ* et immunohistochimiques confirment celles sur la distribution régionale de Ciossek et al (1995, 1999). Pour cette raison, nous n'avons pas trop insisté sur la localisation régionale d'EphA7 dans notre étude.

1.1.1. Hybridation *in situ*

La sonde antisens utilisée est dirigée contre la séquence correspondant au domaine extracellulaire d'EphA7. Ainsi, elle détecte toutes les isoformes d'EphA7. La spécificité de la distribution du marquage obtenu par la sonde antisens a été établie par

comparaison des coupes traitées avec les sondes antisens et sens, respectivement. La sonde sens a donné un signal faible et diffus, alors que les coupes traitées avec la sonde antisens montraient une distribution très différenciée du marquage (voir Annexe 1). D'autre part, le profil de marquage obtenu par hybridation *in situ* correspond tout à fait à celui rapporté d'études antérieures (Ciossek et al., 1995; Valenzuela et al., 1995). Ainsi, le marquage le plus fort résidait dans l'hippocampe, essentiellement dans les couches des cellules pyramidales de CA1, CA2, CA3, avec le CA1 plus fortement marqué que le CA3, ainsi que la couche granulaire du gyrus dentelé. Le cortex cérébelleux montrait également un niveau d'expression d'EphA7 relativement fort, essentiellement dans les cellules de Purkinje. Un signal variable de faible à très faible intensité était également visible dans diverses régions du cerveau.

1.1.2. Immunocytochimie

L'anticorps utilisé dans la présente étude est dirigé contre une séquence d'acides aminés comprenant le domaine kinase d'EphA7 (EphA7-TK+). Ainsi, cet anticorps détecte la forme pleine longueur de la molécule (EphA7-FL), mais pas ses isoformes tronquées. L'analyse à faible grossissement des coupes traitées en immunoperoxydase montre une distribution de la protéine qui est conséquente avec celle de l'ARNm; ce qui constitue une preuve en faveur de la spécificité de l'anticorps utilisé dans cette étude. De plus la distribution du marquage est identique à celle décrite antérieurement par Ciossek et collaborateurs (1999). Aussi, nous avons remarqué que la distribution d'EphA7 dans l'hippocampe ressemble beaucoup à celle d'EphA4 décrite par une étude précédente (Tremblay et al., 2007). Ainsi, dans l'hippocampe, la protéine est

enrichie dans les couches de neuropile, alors que les couches de corps cellulaires ne montrent qu'un faible marquage, toujours avec le CA3 faiblement marqué par rapport au CA1. Cela suggère un transport de la protéine dans les axones et les dendrites, à partir de son lieu de synthèse dans les corps cellulaires. Par contre, dans le cervelet, le marquage, tel que visualisé en microscopie photonique, a été retrouvé essentiellement dans les corps cellulaires des cellules de Purkinje, avec un marquage beaucoup plus faible dans les couches moléculaire et granulaire. Outre ces deux régions, des niveaux d'expression plus faibles ont été observés dans différentes régions du cerveau. L'immunocytochimie sur des coupes provenant des animaux EphA7^{-/-} a donné un signal très faible d'EphA7, en comparaison avec des coupes des souris de type sauvage. Ceci a permis d'établir définitivement la spécificité de notre anticorps.

Notre étude n'a pas examiné la distribution des isoformes tronquées d'EphA7 dans le cerveau adulte. Une étude antérieure (Ciossek et al., 1999) avait démontré que la localisation ces isoformes tronquées du domaine kinase différait de celle d'EphA7-FL. Ces auteurs avaient alors démontré que la forme EphA7-TK- était surtout confinée aux corps cellulaires et parties proximales des dendrites alors qu'EphA7-TK+ était plutôt localisée dans des prolongements neuronaux. Toutefois, rappelons que nos propres observations ont démontré que l'isoforme EphA7-FL est aussi détectable dans le soma des cellules pyramidales et granulaires de l'hippocampe et des cellules de Purkinje du cervelet. Une explication plausible serait une plus forte sensibilité de détection de notre anticorps. Il restera à voir si les isoformes tronquées sont exprimées à la surface des corps cellulaires neuronaux, plutôt que dans des organelles intracellulaires, comme c'est le cas pour l'isoforme pleine longueur.

1.2. Localisation subcellulaire

L'analyse de la distribution ultrastructurale dans les différentes sous-régions de l'hippocampe et du cervelet a révélé que le marquage de surface préférentiel d'EphA7 se retrouve dans des densités post-synaptiques (PSD « *postsynaptic density* ») des épines dendritiques. Ce type de marquage rappelle celui d'EphA4 chez le rat adulte (Tremblay et al., 2007). La plupart du temps, ces épines marquées formaient des synapses asymétriques avec des terminaisons axonales non marquées. Ces types de synapses sont reconnus comme étant des synapses excitatrices. Les dendrites, notamment celles du gyrus dentelé, montraient de leur côté un marquage majoritairement intracellulaire (vésicules, microtubules) mais aussi parfois membranaire (PSD).

La présence d'EphA7 dans les cellules du gyrus dentelé est conséquente avec un rôle de celui-ci dans la neurogenèse adulte, surtout que certaines cellules montraient une intensité de marquage plus élevée que la moyenne. On pourrait spéculer qu'EphA7 intervient dans la migration des neurones néo-formés.

Des axones, généralement non myélinisés, des terminaisons axonales et des prolongements astrocytaires immunopositifs ont aussi été rencontrés. Dans certaines terminaisons axonales, le marquage d'EphA7 ne concernait qu'une petite sous-population des vésicules, comme rapporté pour EphA4 (Tremblay et al., 2007). Par le passé, des expériences de fractionnement cellulaire et de transfert Western ont été utilisées pour confirmer l'association d'EphA4 avec les vésicules synaptiques et celles

à clathrine. EphA4 pourrait donc être impliqué dans le trafic ou la libération des vésicules. De plus la stimulation *in vitro* des neurones de l'hippocampe en culture par le KCL aboutit à une augmentation membranaire d'EphA4 (Bouvier et al., 2010).

Dans le cas des astrocytes, l'immunomarquage observé touchait généralement quelques-uns de leurs feuillet distaux, généralement ceux qui étaient proches des terminaisons axonales; laissant penser à un rôle périssynaptique. Il s'agissait d'une expression à la surface des feuillet astrocytaires, qui pourrait être impliquée dans la motilité de ceux-ci et, ainsi, dans l'efficacité synaptique (Panatier et al., 2006).

Le marquage d'EphA7 a été localisé aussi bien dans les cellules pyramidales du CA1 et CA3 que dans les cellules granulaires du gyrus dentelé ainsi que les cellules de Purkinje du cervelet. Le marquage intracellulaire de ces cellules ressemblait à celui d'EphA4 chez les nouveau-nés P14 et P21 (Tremblay et al., 2009), et concernait généralement les organites de synthèse, de maturation et de transport à savoir l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique rugueux, des saccules et des vésicules. L'intensité du marquage observé pour EphA7 suggère un niveau de synthèse d'EphA7 non négligeable chez les adultes.

La localisation ultrastructurale d'EphA7 a été visualisée en microscopie électronique par une technique d'immunoperoxydase-DAB (diaminobenzidine) en pré-enrobage. Cette technique, combinée à la fixation au PLP, permet une assez bonne préservation de la morphologie et de l'ultrastructure des tissus examinés (McLean and Nakane, 1974; Brown, 2001). Cependant, une limitation du marquage immunohistochimique avec la DAB est sa capacité de diffuser sur une courte distance

(Brown, 2001). Cela fait que, dans les axones, terminaisons axonales et dendrites, où le marquage concernait parfois des vésicules très proches de la membrane plasmique, il était difficile de déterminer avec lequel était l'élément marqué. Par contre, à plusieurs occasions, nous avons observé que la membrane plasmique était clairement immunopositive ou que les vésicules marquées étaient localisées au cœur de la structure loin de la membrane plasmique levant toute interprétation ambiguë.

Nous n'avons pas retrouvé EphA7 dans les grosses terminaisons des fibres moussues de CA3 (stratum radiatum/lucidum), du gyrus dentelé (couche polymorphe) de l'hippocampe, ni dans celles du cervelet. Sur ce point, la localisation subcellulaire d'EphA7 chez l'adulte diffère de celle d'EphA4. En effet, une étude antérieure a rapporté que, dans l'hippocampe de rats adultes, les fibres moussues montraient un très fort immunomarquage pour EphA4 (Tremblay et al., 2007). Ici, les fibres moussues, bien qu'immunonégatives pour EphA7, faisaient des contacts synaptiques avec des épines dendritiques marquées, indiquant qu'elles devaient alors exprimer des éphrines-A complémentaires.

1.2.1. EphA7 et le fonctionnement de la synapse

La localisation d'EphA7 au niveau des densités post-synaptiques des épines, des troncs dendritiques, ou même de somas, que ce soit dans l'hippocampe ou le cervelet, appuie l'hypothèse selon laquelle ce récepteur pourrait, à l'instar de ses homologues Eph, avoir un rôle dans la plasticité, la maturation ou le maintien des synapses. D'un autre côté, cela soulève de nombreuses questions auxquelles il serait judicieux de

répondre afin de mieux saisir l'impact de la présence de ce récepteur au niveau des synapses. Dans cette perspective, des expériences de fractionnement de PSD seraient nécessaires afin de découvrir s'il existe une association physique entre les protéines d'échafaudage de la synapse et EphA7. Tel est le cas pour EphA4 qui a été rapporté comme étant fortement liée aux PSD (Bouvier et al., 2008). Quant à EphB2, il a été démontré qu'il était lié aux récepteurs NMDA dans la cellule post-synaptique (Dalva et al., 2000). Son activation favorise la phosphorylation des récepteurs NMDA, aboutissant à une entrée massive du calcium dans la cellule; ce qui pourrait contribuer à l'induction de la LTP et de la LTD. Chez les animaux EphB2^{-/-}, les courants calciques des récepteurs NMDA sont diminués, empêchant l'induction de la LTP et de la LTD (Grunwald et al., 2001; Henderson et al., 2001).

Précédemment il a été démontré que l'induction de la LTP dans le CA1 de l'hippocampe nécessite l'activation d'EphA4 localisé dans les épines dendritiques. En effet, les auteurs ont rapporté que l'activation de l'éphrine-A3 astrocytaire par le récepteur EphA4 des épines dendritiques modulait la recapture du glutamate par les astrocytes et résultait en une augmentation des concentrations du glutamate et ainsi de la transmission synaptique excitatrice. Les animaux EphA4^{-/-} montraient en effet une augmentation des transporteurs astrocytaires du glutamate ainsi qu'une réduction de la LTP (Filosa et al., 2009, Carmona et al., 2009).

D'autre part, l'activation d'EphA4 par l'éphrine-A3 a aussi été impliquée dans la stabilisation morphologique des épines dendritiques de l'hippocampe (Murai et al., 2003; Palmer and Klein, 2003; Bourgin et al., 2007). En comparaison avec ces études pré-citées, il sera intéressant d'examiner l'implication d'EphA7 dans ces mécanismes,

puisque'il aurait le potentiel de se dimériser ou oligomériser avec EphA4, ou de lier les mêmes éphrines. Sa présence probable dans les mêmes épines dendritiques qu'EphA4, telle que suggérée par nos résultats et ceux de Tremblay et al. (2007), pointe vers de telles possibilités. Éventuellement, une question importante serait de savoir si EphA7 est également impliqué dans les processus d'apprentissage et de mémoire.

Nous avons détecté la présence d'EphA7 à la surface de feuillettes astrocytaires, comme cela avait aussi été rapporté pour EphA4 (Tremblay et al., 2009). Un rôle de l'expression des Eph/éphrines dans les astrocytes dans la régulation de la glio- et neuro-transmission a déjà été proposé (Nestor et al., 2007; Murai and Pasquale, 2011; Zhuang et al., 2011). Nos observations confirment la localisation stratégique d'EphA7 pour un rôle dans les actions pérисynaptiques des astrocytes, notamment leur motilité et l'effet de celle-ci sur l'efficacité synaptique (Panatier et al., 2006).

1.2.2. Données quantitatives

Nous avons effectué une quantification des éléments marqués d'une part et des éléments non marqués d'autre part. Ce comptage nous a permis d'avoir une idée de la fréquence des observations des structures marquées par EphA7. Il s'agissait des épines dendritiques dans toutes les régions de l'hippocampe et du cervelet analysées et des dendrites du gyrus dentelé. Ces deux types de structure ont démontré le plus fort indice de marquage.

Bien que la microscopie électronique ne constitue pas la technique de quantification idéale, le comptage des épines dendritiques marquées par rapport au

nombre total d'épines nous a permis de réaliser qu'EphA7 est localisé dans approximativement la moitié des épines rencontrées. Parfois même un profil unique de dendrite montrait une épine marquée et une autre non marquée. On peut alors proposer un ciblage spécifique du récepteur vers des sous-populations d'épines d'un même neurone. Si tel est le cas, il faudra identifier le mécanisme d'une telle spécificité. L'on pourrait alors comprendre le rôle joué par EphA7 dans les synapses. Contrairement à EphA7, EphA4 a été retrouvé dans à peine 13 % des épines dendritiques (Tremblay et al., 2007).

2. Conclusions et directions futures

Par hybridation *in situ* et immunoperoxydase en microscopie photonique, nous avons étudié le motif d'expression de l'ARNm et de la protéine EphA7 (EphA7-TK+) dans le cerveau de rats adultes. L'ARNm ainsi que la protéine ont été retrouvés dans plusieurs régions du cerveau avec le plus fort marquage localisé dans l'hippocampe et le cervelet, deux régions reconnues pour leur plasticité synaptique. Afin de visualiser la localisation ultrastructurale de la molécule, nous avons eu recours à l'immunoperoxydase en microscopie électronique. Les résultats indiquent qu'EphA7 continue à être présent chez l'adulte. Par ailleurs, nous avons pu faire la distinction entre ses sites de synthèse/trafic et ses sites d'action. Nous avons aussi pu remarquer qu'EphA7 est stratégiquement localisé de façon à pouvoir jouer plusieurs rôles dans l'hippocampe et le cervelet de rats adultes; cela à travers ses effets sur la plasticité de synapses majoritairement excitatrices. Les divers rôles d'EphA7 nécessiteraient différentes combinaisons d'éphrines exprimées soit au niveau pré- ou post-synaptique et sur les cellules gliales. Ainsi des études de double-marquage seraient nécessaires pour déterminer les éphrines-A auxquelles pourrait se lier EphA7 pour être fonctionnel dans le cerveau adulte. De plus des techniques de fractionnement de cellules pourraient être utilisées pour étudier par exemple la relation entre EphA7 et les autres molécules des PSD au niveau des synapses. En se basant sur certains travaux antérieurs, il pourrait aussi s'avérer intéressant de disposer d'un anticorps dirigé contre EphA7-TK- afin d'effectuer une étude de la localisation sous-cellulaire de cette isoforme afin de la comparer à celle d'EphA7-TK+ dont il a été question dans la présente étude.

3. Références

- Akaneya Y, Sohya K, Kitamura A, Kimura F, Washburn C, Zhou R, Ninan I, Tsumoto T, Ziff EB. 2010. Ephrin-A5 and EphA5 interaction induces synaptogenesis during early hippocampal development. *PLoS one* 5(8):e12486.
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology* 137(4):433-457.
- Ashton RS, Conway A, Pangarkar C, Bergen J, Lim KI, Shah P, Bissell M, Schaffer DV. 2012. Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling. *Nature neuroscience* 15(10):1399-1406.
- Bellebaum C, Daum I. 2007. Cerebellar involvement in executive control. *Cerebellum* 6(3):184-192.
- Bourgin C, Murai KK, Richter M, Pasquale EB. 2007. The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting beta1-integrin signaling pathways. *The Journal of cell biology* 178(7):1295-1307.
- Bouvier D, Corera AT, Tremblay ME, Riad M, Chagnon M, Murai KK, Pasquale EB, Fon EA, Doucet G. 2008. Pre-synaptic and post-synaptic localization of EphA4 and EphB2 in adult mouse forebrain. *Journal of neurochemistry* 106(2):682-695.
- Bouvier D, Tremblay ME, Riad M, Corera AT, Gingras D, Horn KE, Fotouhi M, Girard M, Murai KK, Kennedy TE, McPherson PS, Pasquale EB, Fon EA, Doucet G. 2010. EphA4 is localized in clathrin-coated and synaptic vesicles in adult mouse brain. *Journal of neurochemistry* 113(1):153-165.

- Brown WJ. 2001. Immunoperoxidase methods for localization of antigens in cultured cells and tissues. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] Chapter 4:Unit 4 6.
- Carmona MA, Murai KK, Wang L, Roberts AJ, Pasquale EB. 2009. Glial ephrin-A3 regulates hippocampal dendritic spine morphology and glutamate transport. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(30):12524-12529.
- Cesa R, Premoselli F, Renna A, Ethell IM, Pasquale EB, Strata P. 2011. Eph receptors are involved in the activity-dependent synaptic wiring in the mouse cerebellar cortex. PloS one 6(4):e19160.
- Ciossek T, Millauer B, Ullrich A. 1995. Identification of alternatively spliced mRNAs encoding variants of MDK1, a novel receptor tyrosine kinase expressed in the murine nervous system. Oncogene 10(1):97-108.
- Ciossek T, Ullrich A, West E, Rogers JH. 1999. Segregation of the receptor EphA7 from its tyrosine kinase-negative isoform on neurons in adult mouse brain. Brain research Molecular brain research 74(1-2):231-236.
- Contractor A, Rogers C, Maron C, Henkemeyer M, Swanson GT, Heinemann SF. 2002. Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. Science 296(5574):1864-1869.
- Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME. 2000. EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. Cell 103(6):945-956.
- de la Rosa EJ, de Pablo F. 2000. Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. Trends in neurosciences 23(10):454-458.

- Deng W, Aimone JB, Gage FH. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature reviews Neuroscience* 11(5):339-350.
- Depaepe V, Suarez-Gonzalez N, Dufour A, Passante L, Gorski JA, Jones KR, Ledent C, Vanderhaeghen P. 2005. Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* 435(7046):1244-1250.
- Figuerola JD, Benton RL, Velazquez I, Torrado AI, Ortiz CM, Hernandez CM, Diaz JJ, Magnuson DS, Whittemore SR, Miranda JD. 2006. Inhibition of EphA7 up-regulation after spinal cord injury reduces apoptosis and promotes locomotor recovery. *Journal of neuroscience research* 84(7):1438-1451.
- Filosa A, Paixao S, Honsek SD, Carmona MA, Becker L, Feddersen B, Gaitanos L, Rudhard Y, Schoepfer R, Klopstock T, Kullander K, Rose CR, Pasquale EB, Klein R. 2009. Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nature neuroscience* 12(10):1285-1292.
- Frisen J, Holmberg J, Barbacid M. 1999. Ephrins and their Eph receptors: multitasking directors of embryonic development. *The EMBO journal* 18(19):5159-5165.
- Frisen J, Yates PA, McLaughlin T, Friedman GC, O'Leary DD, Barbacid M. 1998. Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 20(2):235-243.
- Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, Flenniken A, Pan L, Ryan TE, Henkemeyer M, Streibhardt K, Hirai H, Wilkinson DG, Pawson T, Davis S, Yancopoulos GD. 1996. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17(1):9-19.

- Gao PP, Yue Y, Cerretti DP, Dreyfus C, Zhou R. 1999. Ephrin-dependent growth and pruning of hippocampal axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(7):4073-4077.
- Goldshmit Y, McLenachan S, Turnley A. 2006. Roles of Eph receptors and ephrins in the normal and damaged adult CNS. *Brain research reviews* 52(2):327-345.
- Grunwald IC, Korte M, Wolfer D, Wilkinson GA, Unsicker K, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R. 2001. Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 32(6):1027-1040.
- Henderson JT, Georgiou J, Jia Z, Robertson J, Elowe S, Roder JC, Pawson T. 2001. The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron* 32(6):1041-1056.
- Henkemeyer M, Itkis OS, Ngo M, Hickmott PW, Ethell IM. 2003. Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *The Journal of cell biology* 163(6):1313-1326.
- Hilborn MD, Vaillancourt RR, Rane SG. 1998. Growth factor receptor tyrosine kinases acutely regulate neuronal sodium channels through the src signaling pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(2):590-600.
- Himanen JP, Chumley MJ, Lackmann M, Li C, Barton WA, Jeffrey PD, Vearing C, Geleick D, Feldheim DA, Boyd AW, Henkemeyer M, Nikolov DB. 2004. Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nature neuroscience* 7(5):501-509.
- Himanen JP, Nikolov DB. 2003. Eph receptors and ephrins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35(2):130-134.

- Holmberg J, Armulik A, Senti KA, Edoff K, Spalding K, Momma S, Cassidy R, Flanagan JG, Frisen J. 2005. Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes & development* 19(4):462-471.
- Holmberg J, Clarke DL, Frisen J. 2000. Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 408(6809):203-206.
- Hruska M, Dalva MB. 2012. Ephrin regulation of synapse formation, function and plasticity. *Molecular and cellular neurosciences* 50(1):35-44.
- Janis LS, Cassidy RM, Kromer LF. 1999. Ephrin-A binding and EphA receptor expression delineate the matrix compartment of the striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(12):4962-4971.
- Jing X, Miwa H, Sawada T, Nakanishi I, Kondo T, Miyajima M, Sakaguchi K. 2012. Ephrin-A1-mediated dopaminergic neurogenesis and angiogenesis in a rat model of Parkinson's disease. *PloS one* 7(2):e32019.
- Karam SD, Burrows RC, Logan C, Koblar S, Pasquale EB, Bothwell M. 2000. Eph receptors and ephrins in the developing chick cerebellum: relationship to sagittal patterning and granule cell migration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20(17):6488-6500.
- Karam SD, Kim YS, Bothwell M. 2001. Granule cells migrate within raphes in the developing cerebellum: an evolutionarily conserved morphogenic event. *The Journal of comparative neurology* 440(2):127-135.
- Khodosevich K, Watanabe Y, Monyer H. 2011. EphA4 preserves postnatal and adult neural stem cells in an undifferentiated state in vivo. *Journal of cell science* 124(Pt 8):1268-1279.

- Klein R. 2004. Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Current opinion in cell biology* 16(5):580-589.
- Kuan CY, Roth KA, Flavell RA, Rakic P. 2000. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends in neurosciences* 23(7):291-297.
- Kullander K, Klein R. 2002. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 3(7):475-486.
- Lee H, Park E, Kim Y, Park S. 2013a. EphrinA5-EphA7 complex induces apoptotic cell death via TNFR1. *Molecules and cells* 35(5):450-455.
- Lee J, Corcoran A, Han M, Gardiner DM, Muneoka K. 2013b. Dlx5 and Msx2 regulate mouse anterior neural tube closure through ephrinA5-EphA7. *Development, growth & differentiation* 55(3):341-349.
- Liebl DJ, Morris CJ, Henkemeyer M, Parada LF. 2003. mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system. *Journal of neuroscience research* 71(1):7-22.
- Lim YS, McLaughlin T, Sung TC, Santiago A, Lee KF, O'Leary DD. 2008. p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* 59(5):746-758.
- Lisabeth EM, Falivelli G, Pasquale EB. 2013. Eph receptor signaling and ephrins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(9).
- Marler KJ, Becker-Barroso E, Martinez A, Llovera M, Wentzel C, Poopalasundaram S, Hindges R, Soriano E, Comella J, Drescher U. 2008. A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(48):12700-12712.

- Marler KJ, Poopalasundaram S, Broom ER, Wentzel C, Drescher U. 2010. Pro-neurotrophins secreted from retinal ganglion cell axons are necessary for ephrinA-p75NTR-mediated axon guidance. *Neural development* 5:30.
- Martinez A, Otal R, Sieber BA, Ibanez C, Soriano E. 2005. Disruption of ephrin-A/EphA binding alters synaptogenesis and neural connectivity in the hippocampus. *Neuroscience* 135(2):451-461.
- Martinez A, Soriano E. 2005. Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain research Brain research reviews* 49(2):211-226.
- McLean IW, Nakane PK. 1974. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 22(12):1077-1083.
- Meier C, Anastasiadou S, Knoll B. 2011. Ephrin-A5 suppresses neurotrophin evoked neuronal motility, ERK activation and gene expression. *PloS one* 6(10):e26089.
- Ming GL, Song H. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70(4):687-702.
- Mori T, Wanaka A, Taguchi A, Matsumoto K, Tohyama M. 1995. Localization of novel receptor tyrosine kinase genes of the eph family, MDK1 and its splicing variant, in the developing mouse nervous system. *Brain research Molecular brain research* 34(1):154-160.
- Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y, Pasquale EB. 2003. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nature neuroscience* 6(2):153-160.
- Murai KK, Pasquale EB. 2002. Can Eph receptors stimulate the mind? *Neuron* 33(2):159-162.

- Murai KK, Pasquale EB. 2004. Eph receptors, ephrins, and synaptic function. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 10(4):304-314.
- Murai KK, Pasquale EB. 2011. Eph receptors and ephrins in neuron-astrocyte communication at synapses. *Glia* 59(11):1567-1578.
- Nestor MW, Mok LP, Tulapurkar ME, Thompson SM. 2007. Plasticity of neuron-glia interactions mediated by astrocytic EphARs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(47):12817-12828.
- Nie D, Di Nardo A, Han JM, Baharanyi H, Kramvis I, Huynh T, Dabora S, Codeluppi S, Pandolfi PP, Pasquale EB, Sahin M. 2010. Tsc2-Rheb signaling regulates EphA-mediated axon guidance. *Nature neuroscience* 13(2):163-172.
- Otal R, Burgaya F, Frisen J, Soriano E, Martinez A. 2006. Ephrin-A5 modulates the topographic mapping and connectivity of commissural axons in murine hippocampus. *Neuroscience* 141(1):109-121.
- Palmer A, Klein R. 2003. Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes & development* 17(12):1429-1450.
- Panatier A, Oliet SH. 2006. Neuron-glia interactions in the hypothalamus. *Neuron glia biology* 2(1):51-58.
- Park E, Kim Y, Noh H, Lee H, Yoo S, Park S. 2013. EphA/ephrin-A signaling is critically involved in region-specific apoptosis during early brain development. *Cell death and differentiation* 20(1):169-180.
- Pasquale EB. 2004. Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear. *Nature neuroscience* 7(5):417-418.

- Pasquale EB. 2005. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nature reviews Molecular cell biology* 6(6):462-475.
- Paxinos G, Watson C. 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney ; Orlando: Academic Press. xxvi, 237 p. of plates p.
- Rashid T, Upton AL, Blentic A, Ciossek T, Knoll B, Thompson ID, Drescher U. 2005. Opposing gradients of ephrin-As and EphA7 in the superior colliculus are essential for topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 47(1):57-69.
- Rogers JH, Ciossek T, Menzel P, Pasquale EB. 1999a. Eph receptors and ephrins demarcate cerebellar lobules before and during their formation. *Mechanisms of development* 87(1-2):119-128.
- Rogers JH, Ciossek T, Ullrich A, West E, Hoare M, Muir EM. 1999b. Distribution of the receptor EphA7 and its ligands in development of the mouse nervous system. *Brain research Molecular brain research* 74(1-2):225-230.
- Roostaei T, Nazeri A, Sahraian MA, Minagar A. 2014. The Human Cerebellum: A Review of Physiologic Neuroanatomy. *Neurologic clinics* 32(4):859-869.
- Scalia F, Currie JR, Feldheim DA. 2009. Eph/ephrin gradients in the retinotectal system of *Rana pipiens*: developmental and adult expression patterns. *The Journal of comparative neurology* 514(1):30-48.
- Scicolone G, Ortalli AL, Carri NG. 2009. Key roles of Ephs and ephrins in retinotectal topographic map formation. *Brain research bulletin* 79(5):227-247.
- Shilo BZ. 1992. Roles of receptor tyrosine kinases in *Drosophila* development. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 6(11):2915-2922.

- Tai AX, Cassidy RM, Kromer LF. 2013. EphA7 expression identifies a unique neuronal compartment in the rat striatum. *The Journal of comparative neurology* 521(12):2663-2679.
- Tai AX, Kromer LF. 2014. Corticofugal projections from medial primary somatosensory cortex avoid EphA7-expressing neurons in striatum and thalamus. *Neuroscience* 274:409-418.
- Theus MH, Ricard J, Bethea JR, Liebl DJ. 2010. EphB3 limits the expansion of neural progenitor cells in the subventricular zone by regulating p53 during homeostasis and following traumatic brain injury. *Stem cells* 28(7):1231-1242.
- Timmann D, Daum I. 2007. Cerebellar contributions to cognitive functions: a progress report after two decades of research. *Cerebellum* 6(3):159-162.
- Torii M, Levitt P. 2005. Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism. *Neuron* 48(4):563-575.
- Torii M, Rakic P, Levitt P. 2013. Role of EphA/ephrin--a signaling in the development of topographic maps in mouse corticothalamic projections. *The Journal of comparative neurology* 521(3):626-637.
- Tremblay ME, Riad M, Bouvier D, Murai KK, Pasquale EB, Descarries L, Doucet G. 2007. Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus. *The Journal of comparative neurology* 501(5):691-702.
- Tremblay ME, Riad M, Chierzi S, Murai KK, Pasquale EB, Doucet G. 2009. Developmental course of EphA4 cellular and subcellular localization in the postnatal rat hippocampus. *The Journal of comparative neurology* 512(6):798-813.

- Valenzuela DM, Rojas E, Griffiths JA, Compton DL, Gisser M, Ip NY, Goldfarb M, Yancopoulos GD. 1995. Identification of full-length and truncated forms of Etk-3, a novel member of the Eph receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* 10(8):1573-1580.
- Yamaguchi Y, Pasquale EB. 2004. Eph receptors in the adult brain. *Current opinion in neurobiology* 14(3):288-296.
- Yeo W, Gautier J. 2004. Early neural cell death: dying to become neurons. *Developmental biology* 274(2):233-244.
- Yun ME, Johnson RR, Antic A, Donoghue MJ. 2003. EphA family gene expression in the developing mouse neocortex: regional patterns reveal intrinsic programs and extrinsic influence. *The Journal of comparative neurology* 456(3):203-216.
- Zhou R. 1998. The Eph family receptors and ligands. *Pharmacology & therapeutics* 77(3):151-181.
- Zhuang Z, Huang J, Cepero ML, Liebl DJ. 2011. Eph signaling regulates gliotransmitter release. *Communicative & integrative biology* 4(2):223-226.

ANNEXE 1

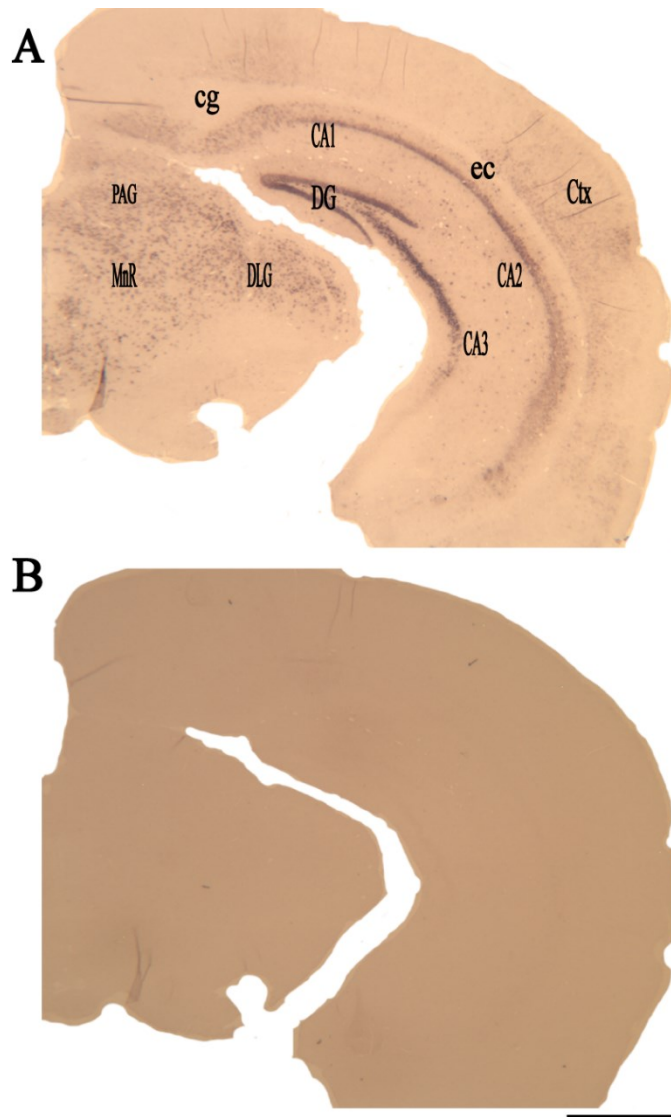


Figure 1: Spécificité de la sonde anti-sens

La spécificité de la sonde antisens est établie à travers la comparaison de coupes de souris traitées avec les sondes antisens (A) et sens (B) respectivement. On notera l'absence de marquage sur les sections traitées avec la sonde sens. Les régions CA1, CA2, CA3 de l'hippocampe ainsi que le gyrus dentelé montrent un fort marquage,

cependant dans le cortex, le marquage est beaucoup plus faible. Cg : cingulum, ec : capsule externe, DLG : noyau géniculé latéral dorsal, MnR : noyau du raphé médian, PAG : substance grise périaqueducule. Barre d'échelle= 1mm. Tirée et modifiée de (Baharnoori, 2007).